

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EFFECTO DE LA EXPRESIÓN DE LA LIPASA LipF EN LA RESISTENCIA A
FÁRMACOS DE PRIMERA LÍNEA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE
Mycobacterium tuberculosis.**

Por

Q.F.B. ANA LETICIA ARRIAGA GUERRERO

**Como requisito para obtener el grado de MAESTRÍA EN CIENCIAS CON
ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA.**

Diciembre, 2016

“EFECTO DE LA EXPRESIÓN DE LA LIPASA LipF EN LA RESISTENCIA A
FÁRMACOS DE PRIMERA LÍNEA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE
Mycobacterium tuberculosis”

Comité de Tesis

Dr. Mario A. Bermúdez de León

Presidente

Dr. Pablo Zapata Benavides

Secretario

Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna

Vocal

Dra. Beatriz Silva Ramírez

Vocal

Dra. Licet Villarreal Treviño

Vocal

“EFECTO DE LA EXPRESIÓN DE LA LIPASA LipF EN LA RESISTENCIA A
FÁRMACOS DE PRIMERA LÍNEA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE
Mycobacterium tuberculosis”

Dirección de Tesis

Dr. Mario A. Bermúdez de León

Director interno

Dra. Katia Peñuelas Urquides

Directora externa

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado para la realización de estudios de posgrado y a la Universidad Autónoma de Nuevo León por abrirme sus puertas y por permitirme adquirir los conocimientos que me ayudaron a salir adelante en los problemas del ámbito académico.

A los doctores Katia Peñuelas Urquides y Mario A. Bermúdez de León por toda la paciencia, consejos, instrucciones, apoyo y ante todo muchas gracias por creer en mí y por la confianza que tuvieron hacia mi persona.

Al doctor Roberto Mercado Hernández por su ayuda en el análisis estadístico.

A mis padres Olga Leticia y Luis Fernando por su apoyo incondicional y a mis hermanos María Fernanda y Luis Fernando simplemente porque los amo.

A mis compañeros de laboratorio Ana Laura, Jorge, Dariela, Alain y sobre todo a mi hermana mayor Laura por todos sus consejos y por abandonarme para que creciera como profesionista.

A Cesar Iván Romo por sus consejos en la primera parte experimental de este proyecto sin la cual dudo pudiera haber avanzado, ¡Gracias por compartir tus experiencias!.

A mis amigos de la maestría Sarahí, Mariela, Maritza y Servando, definitivamente son los mejores, mi familia de Monterrey y a mis amigos de Culiacán Annete, Cristina, Javier, Sergio y Miriam por siempre estar ahí cuando necesitaba su ayuda, a pesar de la distancia.

DEDICATORIA

*Para mis padres Luis Fernando y Olga Leticia
cada logro en mi vida es para ustedes...No hay un
buen edificio sin un excelente arquitecto...*

*y para el Indio panza rajada ¡Ya estamos un
paso más cerca de la meta!*

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	xii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT	xv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	3
2.2 Tuberculosis.....	6
2.2.1 Epidemiología.....	11
2.2.2 Tratamiento.....	14
2.2.2.1 Antimicobacterianos de primera línea	15
2.2.2.2 Antimicobacterianos de segunda línea.....	16
2.3 Resistencia a antimicobacterianos	17
2.4 Gen <i>lipF</i> de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	23
2.5 Modelos de <i>Mycobacterium</i>	24
3. JUSTIFICACIÓN.....	26
4. HIPÓTESIS	27
5. OBJETIVO DEL TRABAJO	28
Objetivo General.....	28
Objetivos particulares	28
6. MATERIAL Y MÉTODOS	29
6.1 Subclonación del gen <i>lipF</i> en el vector pMV261 en <i>Escherichia coli</i>	29

6.1.1 Caracterización de las construcciones plasmídicas.....	29
6.1.1.1 Extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina	31
6.1.2 Purificación del DNA de las construcciones plasmídicas.....	31
6.2 Cultivo y Mantenimiento de <i>M. smegmatis</i>	32
6.3 Caracterización de la cepa mc ² 155 de <i>M. smegmatis</i>	32
6.3.1 Curva de crecimiento de <i>M. smegmatis</i>	33
6.3.2 Comparación de Unidades de McFarland con densidad óptica y unidades formadoras de colonias en <i>M. smegmatis</i>	33
6.4 Expresión de LipF en <i>M. smegmatis</i>	34
6.5 Evaluación de la expresión de LipF en la condición de resistencia a fármacos en <i>M. smegmatis</i>	34
6.5.1 Actividad de fármacos de primera línea en las cepas de micobacterias con expresión de LipF mediante el método de microdilución en placa con el compuesto rezasurina.....	34
6.5.2 Cinéticas de crecimiento de <i>M. smegmatis</i> con el fármaco RIF	35
6.5.3. RT-PCR punto final	36
6.5.3.1. Extracción de RNA de <i>M. smegmatis</i>	36
6.6 Análisis estadístico	36
7. RESULTADOS	38
7.1 Subclonación del gen <i>lipF</i> en el vector pMV261 en <i>Escherichia coli</i>	38
7.1.1 Caracterización y purificación de las construcciones plasmídicas	40
7.2 Cultivo y caracterización de la cepa mc ² 155 de <i>M. smegmatis</i>	45
7.2.1 Curva de crecimiento de <i>M. smegmatis</i>	46
7.2.2 Comparación de unidades de Mcfarland con densidad óptica y unidades formadoras de colonias en cultivos de <i>M. smegmatis</i>	47
7.3 Expresión de LipF en <i>M. smegmatis</i>	49

7.4 Evaluación de la expresión de LipF en la condición de resistencia a fármacos en <i>M. smegmatis</i>	49
7.4.1 Amplificación de <i>lipF</i> por RT-PCR.....	49
7.4.2 Actividad de fármacos de primera línea en las cepas de micobacterias con expresión de LipF mediante el método de microdilución en placa con el compuesto rezasurina.....	50
8. DISCUSION.....	54
9. CONCLUSIONES	57
10. PERSPECTIVAS	58
BIBLIOGRAFÍA.....	59
RESUMEN BIBLIOGRÁFICO	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Grupo de fármacos usados para el tratamiento de la tuberculosis	16
Tabla 2. . Secuencias nucleóticas de <i>primers</i> específicos para <i>lipF</i> y el vector pMV261.....	31
Tabla 3. Rango de concentración de los fármacos utilizados en el método de microdilución en placa para <i>M. smegmatis</i>	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología microscópica y macroscópica de <i>M. tuberculosis</i>	4
Figura 2. Representación esquemática de la pared celular de <i>M. tuberculosis</i>	5
Figura 3. Descripción esquemática del granuloma	7
Figura 4. Ciclo infeccioso de <i>M. tuberculosis</i> y la progresión de la enfermedad	9
Figura 5. Manifestaciones clínicas de Tuberculosis.	11
Figura 6. Incidencia Mundial de TB	12
Figura 7. Incidencia de TB en México.....	13
Figura 8. Incidencia mundial de TB-MFR. Casos reportados en porcentajes	18
Figura 9. Expresión diferencial de genes en una cepa pansensible H37Rv (pansensitive strain) y un aislado clínico MFR (MDR isolate).....	21
Figura 10. Expresión diferencial del gen <i>lipF</i> en aislados clínicos de <i>M. tuberculosis</i> con diferentes perfiles de resistencia a fármacos.....	22
Figura 11. Digestión de los vectores LipF-TOPO y pMV261 usando la enzima <i>Bam</i> HI.	39
Figura 12. Purificación del fragmento del gen <i>lipF</i> y del vector linearizado pMV261 ...	39
Figura 13. Extracción de DNA plasmídico de los candidatos de la construcción pMV261-LipF	40
Figura 14. Amplificación del gen <i>lipF</i> a partir de los candidatos de la construcción pMV261-LipF mediante PCR.....	40
Figura 15. Caracterización de las construcciones pMV261-LipF mediante PCR usando combinaciones de los <i>primers</i> LipF-F, LipF-R y pMV261-F.....	41
Figura 16. Secuenciación automatizada de la construcción pMV261-LipF usando los <i>primers</i> internos de LipF.....	42
Figura 17. Alineamiento de la secuencia del candidato 4 con la secuencia de referencia del gen <i>lipF</i> (NCBI, No. Acceso 000962.3)	43
Figura 18. Evaluación de la fidelidad de la secuenciación automatizada de los candidatos pMV261-LipF usando el <i>primer</i> LipF interno F.....	44
Figura 19. Purificación de las construcciones sentido y antisentido de pMV261-LipF ..	45
Figura 20. Activación y mantenimiento de la cepa ATCC mc ² 155 de <i>M. smegmatis</i>	46
Figura 21. Morfología microscópica de la cepa ATCC mc ² 155 de <i>M. smegmatis</i>	46

Figura 22. Curva de crecimiento de <i>M. smegmatis</i>	47
Figura 23. Comparación de crecimiento de <i>M. smegmatis</i> obtenido por unidades de McFarland y densidad óptica a 600 nm	48
Figura 24. Crecimiento de <i>M. smegmatis</i> . Se evaluó el crecimiento mediante nefelometría (en unidades de McFarland) y en unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL)	48
Figura 25. Transformación de <i>M. smegmatis</i> con la construcción pMV261-LipF.	49
Figura 26. Expresión de <i>lipF</i> en <i>M. smegmatis</i> transformada con pMV261-LipF	50
Figura 27. Concentraciones mínimas inhibitorias de <i>M. smegmatis</i> para los fármacos de primera línea.....	51
Figura 28. Concentraciones mínimas inhibitorias de <i>M. smegmatis</i> expresando LipF para los fármacos de primera línea	52
Figura 29. Curva de crecimiento con el fármaco RIF de <i>M. smegmatis</i> expresando LipF.	53

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

°C	Grado Centígrado
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µFD	Microfaradio
AAR	Ácido Alcohol Resistente
ACF	Adjuvante Completo de Freund
ADC	(<i>bovine Albumin, Dextrose, Catalase</i>) Albumina bovina, dextrosa, catalasa
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
DNA	(<i>Desoxyribonucleic acid</i>) ácido desoxiribonucleico
EMB	Etambutol
g	Gramo
h	Hora
kDa	Kilodalton
kV	Kilovoltios
IL-6	Interleucina 6
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
INH	Isoniazida
LB	Luria Bertani
M	Molar
MDR	<i>Multidrug resistance</i>
MFR	Multifármacorresistente

MTC	(<i>Mycobacterium tuberculosis complex</i>) Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
mg	Miligramo
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
OADC	(<i>Oleic acid, bovine Albumin, Dextrose, Catalase</i>) Ácido oleico, albumina bovina, dextrosa, catalasa
Ohms	Ohmio
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
PCR	(<i>Polymerase chain reaction</i>) Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógenos
PZA	Pirazinamida
RIF	Rifampicina
RNA	(<i>Ribonucleic acid</i>) Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Retrotranscripción
s	Segundo
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TB	Tuberculosis
TLR	(<i>toll like receptors</i>) Receptores tipo Toll
Tm	Temperatura media
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colonias por mililitro

RESUMEN

De acuerdo a la Organización Mundial de la salud (OMS), la enfermedad tuberculosis es la segunda causa de muerte por enfermedad infecciosa. En México, hasta la semana 35 del año 2016, se han reportado 11, 029 nuevos casos. Nuevo León es el tercer lugar a nivel nacional en casos de esta enfermedad. El principal agente etiológico de tuberculosis en humanos es *Mycobacterium tuberculosis*. Los fármacos de primera línea para el tratamiento por infección de *M. tuberculosis* son: rifampicina (RIF), isoniazida (INH), pirazinamida (PZA) y etambutol (EMB). Cuando el tratamiento farmacológico no se cumple adecuadamente se puede generar resistencia en el bacilo. Comúnmente la resistencia a fármacos en *M. tuberculosis* se ha asociado a la presencia de mutaciones; sin embargo, en algunos casos no se ha observado dicha asociación, sugiriendo que existe otro(s) mecanismo(s) involucrado(s). En estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación, se efectuó un análisis de expresión génica global de la cepa sensible H37Rv y de un aislado clínico MFR denominado CIBIN:UMF:15:99 de *M. tuberculosis*, donde se observó una expresión diferencial de genes entre las dos cepas. Entre otros, el gen *lipF* mostró una disminución en su expresión en la cepa MFR. Para comprobar la asociación de este gen con la farmacorresistencia nuestro grupo realizó un análisis de los genes diferencialmente expresados en aislados clínicos de *M. tuberculosis* con diferentes perfiles de resistencia a fármacos. Encontrándose, una disminución en la expresión de *lipF* en aproximadamente el 90% de las cepas resistentes comparado con la cepa sensible H37Rv. Por lo cual, en este estudio se decidió evaluar el efecto de la expresión de este gen en el fenómeno de la farmacorresistencia de *M. tuberculosis*. Para alcanzar este objetivo, se realizó la subclonación del gen *lipF* en el vector micobacteriano pMV261, y la proteína LipF se expresó en una cepa modelo de *M. tuberculosis*. Se comprobó la expresión de LipF por medio de ensayos de RT-PCR punto final. El efecto de la expresión de LipF en la resistencia a fármacos de primera línea fue evaluado usando el método de microdilución en placa y cinéticas de crecimiento. Encontramos que la expresión de LipF modifica la concentración mínima inhibitoria para RIF. Estos resultados sugieren que una baja expresión de LipF podría ser importante para el desarrollo de la resistencia a RIF en *M. tuberculosis*.

ABSTRACT

According to the World Health Organization (WHO), tuberculosis (TB) is the second cause of mortality due to infection. In Mexico, until week 35 of 2016, it was reported 11, 029 new cases. The state of Nuevo Leon has the third place with the higher number of cases in Mexico. The causative agent of tuberculosis is *Mycobacterium tuberculosis*. The scheme of treatment for TB consists in the use of drugs as rifampicin, isoniazid, ethambutol and pyrazinamide. When there is not a treatment adherence by the patient, the multidrug resistance (MDR) strains will be selected and clonally amplified. Generally MDR phenomenon has been associated with mutations. However, in some MDR strains no mutations have been identified, which suggests that other mechanisms could be involved. Previously, our research team performed an global expression study and compared the transcriptome between the pansensitive H37Rv strain and a clinical MDR isolate, called CIBIN:UFM:15:99, of *Mycobacterium tuberculosis*. A set of genes differentially expressed was observed, and among them the *lipF* gene was down-regulated in the MDR strain. Another study with 24 clinical isolates with different drug resistance profile and genetic background was performed, and consistently with the previous findings, *lipF* expression was reduced in ~90% of strains compared with the pansensitive strain H37Rv. The aim of this work was to evaluate the effect of expression of *lipF* gene in drug resistance of *M. tuberculosis*. For this objective, the *lipF* subcloning in pMV261 was performed and the protein LipF was expressed in a surrogate model of *M. tuberculosis*. The verification of *lipF* expression was performed through RT-PCR and the effect of *lipF* expression in resistance to first-line drugs was evaluated using the method of microdilution in plate and growth kinetics. We found that LipF expression modify the minimum inhibitory concentration threshold for rifampicin. These results suggest that a lower expression of LipF might be important to develop rifampicin resistance in *M. tuberculosis*.

1. INTRODUCCIÓN

El principal agente etiológico de la tuberculosis en humanos es *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), el cual es un microorganismo de forma bacilar con un tamaño de 2-4 μm de longitud y 0.2-0.5 μm de ancho, aerobio obligado, aunque puede sobrevivir en ambientes con poca cantidad de oxígeno ya que es un parásito intracelular facultativo de macrófagos (TexBookofBacteriology.net). La infección con este microorganismo se adquiere por la vía respiratoria, mediante la inhalación de microgotas en aerosoles que son generadas al hablar, toser o estornudar, y que contienen el bacilo viable (Guirado *et al.*, 2013 y TexBookofBacteriology.net).

La tuberculosis es la segunda causa de muerte por enfermedad infecciosa de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la principal por enfermedad infecto-respiratoria (Campen *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2014). En 2014 se presentaron 6 millones de casos a nivel mundial, con 1.5 millones de muertes (OMS, 2015). Hasta la semana 35 de 2016 se han reportado 11,029 nuevos casos, siendo Nuevo León el tercer lugar a nivel nacional en casos de tuberculosis con 867 casos en el mismo año (Boletín Epidemiológico Nacional, Secretaría de Salud, 2016).

La tuberculosis es tratada con los fármacos de primera línea: rifampicina (RIF), isoniazida (INH), pirazinamida (PZA) y etambutol (EMB) (OMS, 2014). Cuando el tratamiento no se sigue adecuadamente puede presentarse resistencia o bien multifármacorresistencia (MFR). Este último caso se presenta cuando las micobacterias son resistentes al menos a los dos fármacos de primera línea, INH y RIF. El surgimiento de la tuberculosis multifármacorresistente (TB-MFR) ha complicado el tratamiento y el control de la enfermedad, ya que en este caso se debe recurrir a fármacos de segunda línea o de reciente desarrollo, los cuales presentan un mayor costo y una mayor toxicidad (LoBue, 2009). La TB-MFR es un problema que se ha incrementado y que se ha asociado con un alto rango de muerte (del 50 al 80%) en un plazo relativamente breve (Rattan *et al.*, 1998). Se estima que más de 480,000 nuevos casos fueron diagnosticados en 2013 en todo el mundo. En México, se ha reportado que del 12 al 33% de los casos de tuberculosis presentan multifármacorresistencia, mientras que en Nuevo León el porcentaje de MFR es del 17% (Becerril-Montes *et al.*, 2013).

La resistencia a los fármacos de primera línea en *M. tuberculosis* se ha asociado a la presencia de mutaciones en genes blanco o en genes que codifican para enzimas que activan a estos fármacos. Sin embargo, estas mutaciones en algunos casos no están presentes en las cepas resistentes, sugiriendo que existen otros mecanismos involucrados en este fenómeno (Chaoui *et al.*, 2009; Peñuelas-Urquides *et al.*, 2013). En estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación, donde se efectuó un análisis global comparando el perfil de expresión génica de la cepa sensible H37Rv y del aislado clínico MFR CIBIN:UMF:15:99 de *M. tuberculosis*, se encontró una expresión diferencial de genes entre las dos cepas. Se observó que 8 genes mostraron diferencias significativas en sus niveles de expresión: *esxG*, *esxH*, *rpsA*, *esxI* y *rpmI*, los cuales presentaron un incremento en su expresión en el aislado clínico MFR, mientras que los genes *lipF*, *groES* y *narG* presentaron una disminución en su expresión en este mismo aislado con respecto a la cepa H37Rv (Peñuelas-Urquides *et al.*, 2013). Para comprobar si estos genes estaban asociados con la farmacorresistencia, nuestro grupo realizó un análisis de los genes diferencialmente expresados en 24 aislados clínicos de *M. tuberculosis* con diferentes perfiles de resistencia a fármacos y diferente fondo genético (González-Escalante *et al.*, 2015). Los resultados mostraron una importante diferencia en la expresión de los genes *esxH*, *infA*, *lipF* y *groES* en los aislados clínicos resistentes, concordante con lo observado por Peñuelas-Urquides *et al.* (2013). En el 90% de las cepas estudiadas se observó una disminución en la expresión de *lipF*, de las cuales un 75% mostró una disminución de la expresión de este gen mayor al 50% comparado con la cepa pansensible H37Rv (Gonzalez-Escalante *et al.*, 2015).

El gen *lipF* (Rv3487c) consta de 834 nucleótidos, codifica para una proteína de 277 aminoácidos con un peso molecular de alrededor de 29.4 kDa y un punto isoelectrico de 7.49 (Reddy *et al.*, 2009 y Zhang *et al.*, 2005). Esta proteína es una carboxilesterasa, la cual posee también actividad de fosfolipasa C (Chen *et al.*, 2014; Srinivas *et al.*, 2008). LipF podría modificar la pared o alterar el metabolismo de la micobacteria para resistir a condiciones de estrés ácido (Gonzales y Saviola, 2009). En micobacterias se desconoce si LipF está involucrado en la resistencia a fármacos, por lo que en el presente trabajo se evaluó el efecto de la expresión de LipF con la condición de resistencia a fármacos de primera línea en un modelo experimental de *M. tuberculosis*.

2. ANTECEDENTES

2.1 *Mycobacterium tuberculosis*

M. tuberculosis forma parte del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC), el cual comprende siete especies relativamente relacionadas con distintos tropismos en el hospedero incluyendo los patógenos humanos *M. africanum* y *M. canettii*, y a las especies animales adaptadas *M. bovis* (que infecta a bovinos), *M. caprae* (cabras), *M. pinnipedii* (focas) y *M. microti* (roedores). Los miembros de este complejo son considerados genéticamente monomórficos con un alto nivel de similaridad en sus secuencias genómicas (>99.95%), en los cuales se puede presentar una limitada transferencia de genes y una población de estructura clonal (Homolka *et al.*, 2010). Las bacterias del género *Mycobacterium* son bacilares y no móviles. *M. tuberculosis* presenta un tamaño de 2-4 µm de longitud y 0.2-0.5µm de ancho, es un microorganismo aerobio obligado aunque puede sobrevivir en ambientes con poca cantidad de oxígeno; usualmente es un parásito intracelular facultativo de macrófagos. *M. tuberculosis* tiene un tiempo de generación lento, de 15-20 h, lo cual puede contribuir a su virulencia (TexBookofBacteriology.net). Los medios sólidos para el cultivo de este microorganismo son agar Middlebrook y medio Lowenstein Jensen, en los cuales presenta un crecimiento ramificado, formando un micelio no verdadero en forma de cordón (Brook, 2005) (Figura 1).

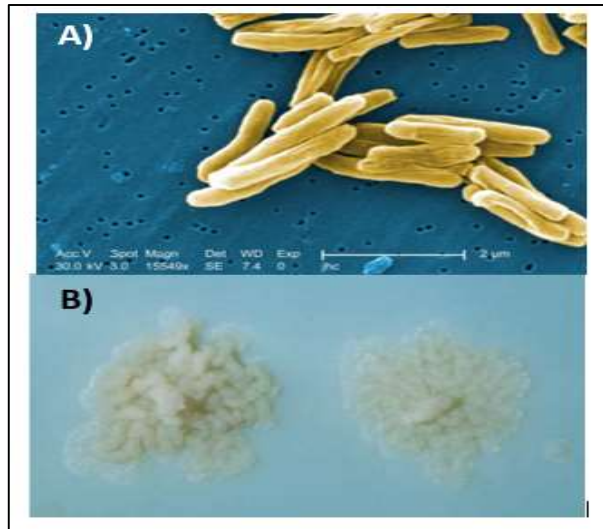


Figura 1. Morfología microscópica y macroscópica de *M. tuberculosis*. Panel A, Micrografía electrónica de barrido mostrando a los bacilos de *M. tuberculosis*. Magnificado 15,549×. Panel B, Colonias de *M. tuberculosis* en medio Lowenstein-Jensen. Adaptado de CDC, 2015.

M. tuberculosis presenta una pared celular única, cerca del 60% está constituida por lípidos y su principal característica es que, además de peptidoglicanos, presenta ácidos micólicos. Éstos son lípidos α -ramificados altamente hidrofóbicos. Los ácidos micólicos representan el 50% del peso seco de la micobacteria, formando una pared de lípidos alrededor del microorganismo y brindándole baja permeabilidad. Esta característica contribuye a la virulencia, ya que es probable que gracias a los ácidos micólicos se prevenga la acción de lisozima y radicales de oxígeno durante la fagocitosis. Además, las micobacterias presentan la proteína “*Cord Factor*”, la cual es responsable del crecimiento característico de *M. tuberculosis* en forma de serpentina. Esta proteína inhibe la maduración de los polimorfonucleares por lo que es más abundante en micobacterias virulentas. *M. tuberculosis* presenta también el péptidoglucolípid *Wax-D* que es el componente que se encuentra en mayor proporción en el adyuvante completo de Freund (ACF), además de mannitol monoleato y aceite mineral. El ACF se administra conjuntamente con el antígeno para mejorar la inmunogenicidad mediante la activación de los receptores tipo Toll (TLR), y por lo tanto, aumenta la respuesta inmune inducida por la vacuna (TexBookofBacteriology.net

y Rich, 2008). *M. tuberculosis* también presenta una envoltura que contribuye a la capacidad de *M. tuberculosis* para sobrevivir en los fagocitos del hospedero y provee una fuente de antígenos glucolipídicos para células T (Kaufmann, 2001) (Figura 2).

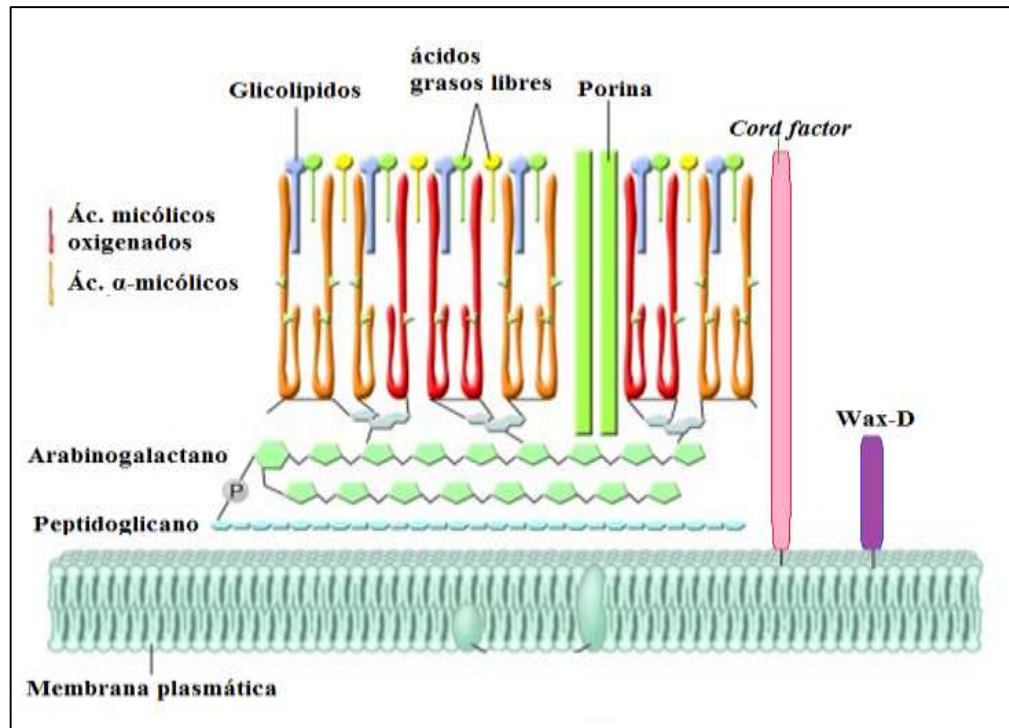


Figura 2. Representación esquemática de la pared celular de *M. tuberculosis*. Existen 2 formas de ácidos micólicos, 1) ácidos α-micólicos (Naranja) que es la forma más abundante, y 2) micolatos oxigenados (Rojo) que se encuentran unidos covalentemente a la capa de arabinogalactano que está unida al peptidoglicano. Además se encuentran otros complejos de lípidos como glicolípidos y lípidos libres. La pared celular contiene también la proteína *Cord factor* (Rosa) y Wax-D (Morado). Modificado de Riley, 2007.

Las características de la pared celular hacen que las bacterias del género *Mycobacterium* no se pueda teñir por el método convencional de tinción Gram. Para estas bacterias se usa la tinción Ziehl-Neelsen, la cual es utilizada para bacterias ácido alcohol resistentes (AAR). Las bacterias AAR se tiñen rojas mientras el fondo de la preparación y las bacterias que no son AAR toman una coloración azul (Brook, 2005).

2.2 Tuberculosis

La principal bacteria causante de la tuberculosis es *M. tuberculosis*, la cual es adquirida por la vía respiratoria. La infección ocurre después de la inhalación de microgotas en aerosoles que contienen el bacilo viable (Guirado *et al.*, 2013). Una microgota contiene no más de 3 bacilos. Las pequeñas microgotas permanecen en el aire por un periodo de tiempo largo y son generadas al hablar, toser y estornudar (TexBookofBacteriology.net). *M. tuberculosis* está exquisitamente adaptada al humano y es considerado como un patógeno intracelular prototípico de macrófagos, y son los macrófagos alveolares el principal blanco de la infección y enfermedad (Guirado *et al.*, 2013). La progresión de la enfermedad depende de la cepa infectante, la exposición primaria, la vacunación y estado inmune del hospedero, así como la dosis infectiva (TexBookofBacteriology.net). La tuberculosis puede ser pulmonar, extrapulmonar o ambas. Los síntomas en la fase temprana no son específicos, se presenta fiebre y sudores nocturnos, pérdida de peso, anorexia, malestar general, debilidad y tos con esputo algunas veces con presencia de sangre (Harrison's, 2015).

M. tuberculosis es particularmente efectiva en evadir de muchas maneras al sistema inmune, y esta es la razón por la cual es un patógeno tan exitoso y de difícil erradicación. El bacilo es inhalado a través de la nariz y la boca, pasa a la tráquea, bronquios, bronquiolos y eventualmente a los alveolos en los pulmones (Learner *et al.*, 2015). La fagocitosis de *M. tuberculosis* por los macrófagos alveolares y células dendríticas inicia una cascada de eventos que envuelve la producción de citosinas y quimiocinas, las cuales estimulan la activación de la fagocitosis y reclutan leucocitos polimorfonucleares al sitio de infección. La acumulación de estos leucocitos dirige a la formación de una masa celular rica en macrófagos conocida como granuloma (Figura 3). La función del granuloma es controlar el crecimiento del bacilo intracelularmente y limitar su diseminación. A medida que el bacilo es controlado y la infección latente es estabilizada, los granulomas disminuyen de tamaño y celularidad (Guirado *et al.*, 2013).

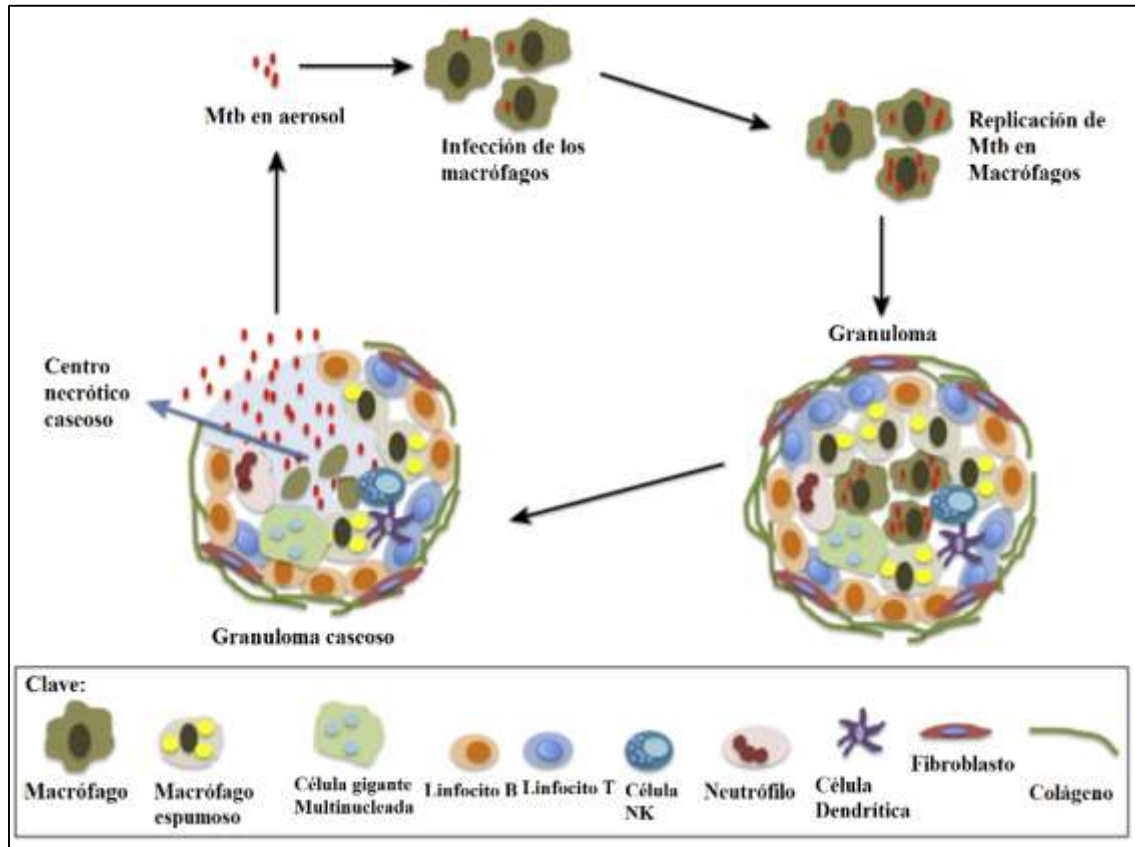


Figura 3. Descripción esquemática del granuloma. Los macrófagos fagocitan los bacilos de *M. tuberculosis* contenidos en las microgotas de aerosol, los cuales se replican dentro de ellos y son rodeadas por células del sistema inmune como linfocitos, neutrófilos, células NK (*Natural Killers*), macrófagos espumosos (que contienen un alto contenido de lípidos), además de otras células como fibroblastos y colágeno. Los granulomas restringen la infección y mantienen un estado de latencia. En la tuberculosis activa el granuloma se convierte en caseoso, resultando en la liberación del contenido necrótico en donde se encuentran las micobacterias ya en una etapa replicativa. El crecimiento del granuloma conduce a la fibrosis y a la destrucción de los tejidos que se encuentran alrededor, conduciendo a la cavitación y a la liberación de *M. tuberculosis*. Adaptado de Guetta y Balganes, 2015.

En la fase de latencia *M. tuberculosis* se encuentra dentro de los granulomas en un estado inactivo donde puede permanecer en individuos competentes por décadas (Gueetha y Balganes, 2015). Sin embargo, cuando el sistema inmune está comprometido, la respuesta granulomatosa no es completamente protectora, por lo que el bacilo continua replicándose conduciendo a la fase activa de la enfermedad (Guirado *et al*, 2013; Gueetha *et al.*, 2015). Menos de un 10% de los individuos infectados por *M. tuberculosis* desarrollarán tuberculosis durante su vida, pero una vez desarrollada y sin un tratamiento adecuado es fatal en el 50% de los pacientes (Kaufmann, 2001). Después de 7-21 días de iniciada la primera fase de la infección, la bacteria se replica de forma no limitada dentro de los macrófagos infectados (TexBookofBacteriology.net) (Figura 4).

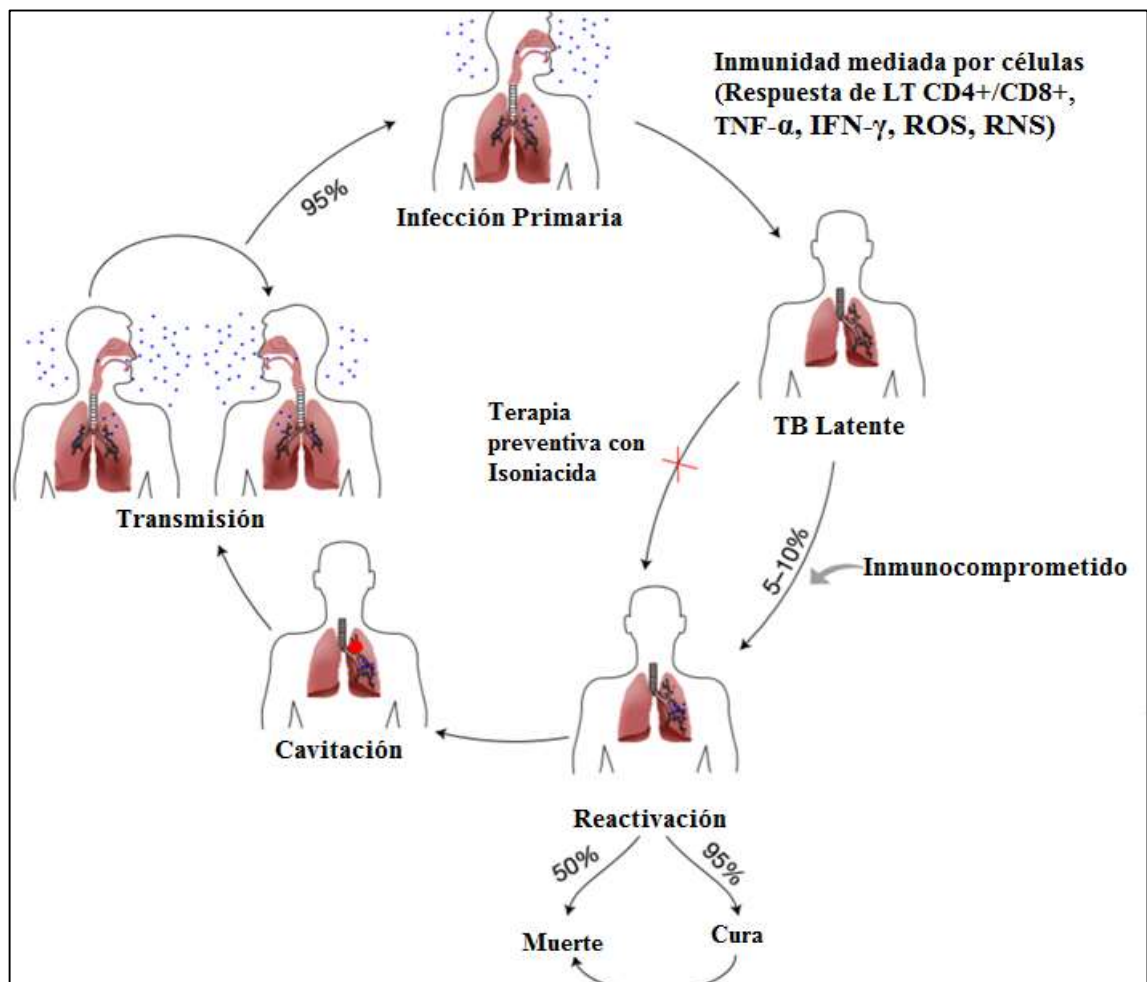


Figura 4. Ciclo infeccioso de *M. tuberculosis* y la progresión de la enfermedad. *M. tuberculosis* es transmitida por aerosoles y, en un 95% de los casos en el que la micobacteria es inhalada, se establece una infección primaria. Esta infección se compensa por el surgimiento de la inmunidad mediada por células o es contenida dentro del granuloma en la forma latente, en la cual no se muestran síntomas, pero el bacilo persiste en un estado de inactivación dentro del hospedero. El progreso de la enfermedad puede detenerse en algunos casos por la terapia preventiva con INH. Este estado podría permanecer durante toda la vida del individuo infectado o progresar a tuberculosis activa por reactivación de la infección existente cuando el individuo se encuentre inmunocomprometido, conduciendo en un 50% de los casos a la muerte o a la formación de una cavitación y la transmisión de la bacteria a otros individuos. Modificado de Kumar et al, 2011.

La tuberculosis pulmonar (TBP) es la forma en la que convencionalmente se presenta la enfermedad, puede ser categorizada como infección primaria o post-primaria. La infección primaria ocurre después de la infección inicial con el bacilo. Esta puede ser

asintomática o presentar sintomatología como fiebre y ocasionalmente dolor torácico pleurítico. La lesión granulomatosa formada después de una infección inicial es usualmente periférica y acompañada de linfopatía transicional hilar o paratraqueal la cual puede ser visible o no usando una radiografía torácica estándar. En la mayoría de los casos la lesión sana espontáneamente y se convierte únicamente en un pequeño nódulo calcificado. En niños pequeños, en donde su respuesta inmune celular no ha madurado y en personas inmunocomprometidas, la TBP progresa con mayor velocidad. En estas personas, la TBP puede evolucionar de diferentes maneras: la primera es una efusión pleural la cual es encontrada en dos tercios de los casos, también puede desarrollarse neumonía y, en ausencia de una respuesta suficiente del sistema inmune, la infección se disemina como pequeñas lesiones granulares que se desarrollan en múltiples órganos resultando en una meningitis tuberculosa (Harrison's, 2015) (Figura 5A).

La infección post-primaria, también conocida como reactivación o TBP secundaria, resulta de la reactivación endógena de tuberculosis latente o de una re-infección, está usualmente localizada en un segmento atípico y posterior de los lóbulos superiores, ya que en los lóbulos el promedio de tensión de oxígeno es alto, lo que favorece al crecimiento de la micobacteria. La sintomatología de la infección post-primaria varía enormemente de pequeños infiltrados a una enfermedad cavitaria extensa, en donde el líquido necrótico infectado es finalmente descargado dentro de las vías respiratorias, lo que puede conducir a una diseminación broncogénica resultando en lesiones satelitales dentro de los pulmones. La infección post-primaria puede conducir a neumonía en un tercio de los pacientes, ocurrir una remisión espontánea o convertirse en crónica con un curso progresivo debilitante donde algunas lesiones se pueden convertir en fibrosas y después calcificarse (Harrison's, 2015) (Figura 5B).

La tuberculosis extra pulmonar (TBE) tiene una incidencia de aproximadamente 10-40% de los pacientes y más de un tercio de quienes desarrollan este tipo de tuberculosis son pacientes VIH positivos. La TBE se presenta principalmente en los nódulos linfáticos, en la pleura, tractogenitourinario, huesos, articulaciones, meninges, peritoneo y pericardio, aunque virtualmente todos los órganos pueden verse afectados. La TBE de los nódulos linfáticos es la más común y es causada principalmente por *M.*

bovis. Aunque se ha encontrado que esta infección es causada también en una menor proporción por *M. tuberculosis*. La sintomatología de la TBE consta en el 50% de los casos de fiebre y síntomas sistémicos. Además se presenta inflamación indolora de los nódulos linfáticos en los sitios posterior cervical y supraclavicular principalmente (Harrison's, 2015) (Figura 5C).

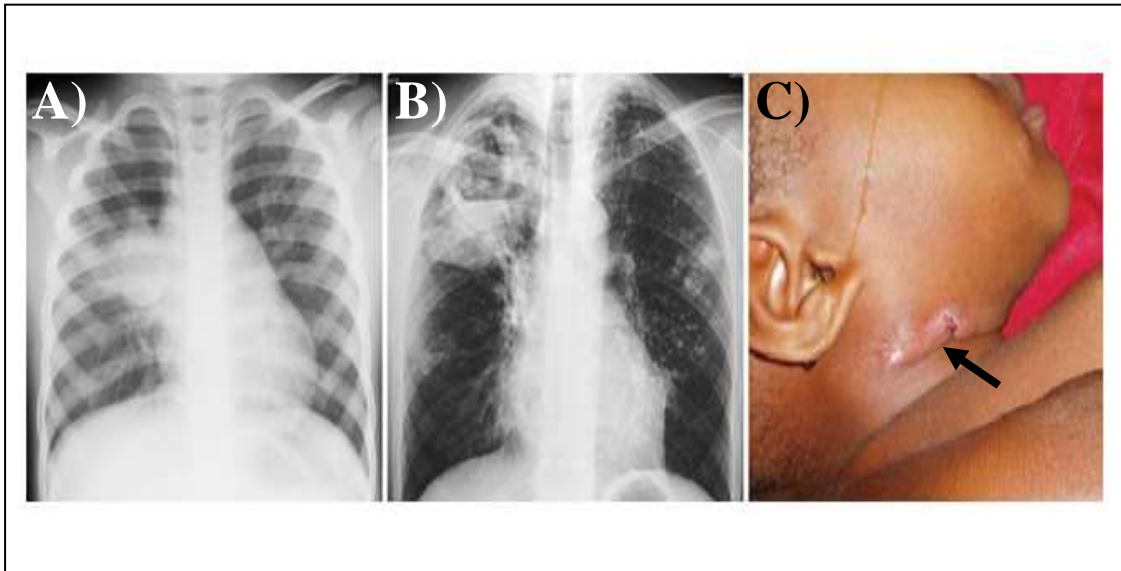


Figura 5. Manifestaciones clínicas de Tuberculosis. A) radiografía torácica mostrando nódulo linfático con infiltración en el pulmón derecho en un niño con tuberculosis primaria. B) Radiografía torácica mostrando infiltrado en el lóbulo superior derecho y una cavidad con nivel de fluido de aire en un paciente con tuberculosis activa. C) Linfadenitis tuberculosa afectando los nódulos linfáticos cervicales. Adaptado de Harrison's principles of Internal Medicine, 2015..

2.2.1 Epidemiología

Tres eventos han colocado a la tuberculosis como una enfermedad en la agenda mundial. Primero, la incidencia mundial del estudio de 1990 que identificó a la tuberculosis como una de las 10 principales causas de morbilidad y mortalidad, ya que se presentó un alto rango de fatalidad (alrededor del 50%); segundo, los análisis subsecuentes que demostraron que la enfermedad se encontraba propagándose en personas con VIH/SIDA; y tercero, estudios clínicos y económicos que mostraron que la combinación del tratamiento con fármacos para tuberculosis era uno de los más costo-

efectivo de todas las intervenciones de salud. Por lo que, en respuesta a todas estas observaciones, la OMS lanzó una nueva estrategia de control basada en la observación directa del tratamiento y manteniendo un corto periodo de tratamiento farmacológico (Dye y Williams, 2010).

La tuberculosis es la segunda causa de muerte por enfermedad infecciosa de acuerdo a la OMS y la principal por enfermedad infecto-respiratoria (Campen *et al*, 2015; Chen *et al.*, 2014). En 2014, se presentaron 6 millones de nuevos casos de TB a nivel mundial con 1.5 millones de muertes (OMS, 2015) (Figura 6). Según la OMS, en el año 2014 se presentaron 21,196 casos de TB en México, y hasta la semana 35 de 2016 se han reportado 11,029 nuevos casos. Nuevo León es el tercer lugar a nivel nacional en casos de tuberculosis, presentándose 867 casos en lo que va del año solo por debajo de Baja California y Veracruz, con 1,208 y 1,106 casos de TB, respectivamente (Semana Epidemiológica, Secretaria de salud, 2016) (Figura 7).

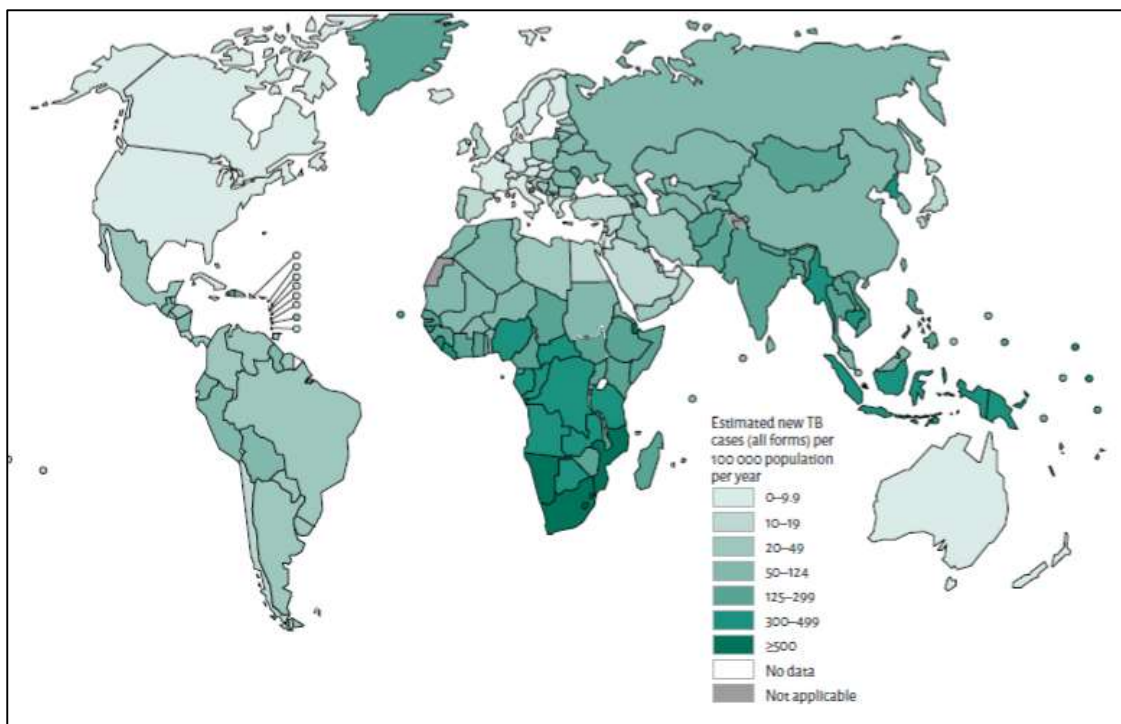
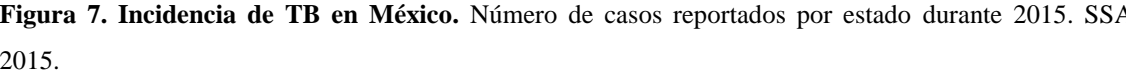


Figura 6. Incidencia Mundial de TB. Incidencia estimada en el año 2014. OMS, 2015



2.2.2 Tratamiento

M. tuberculosis tiene un tiempo de generación prolongado y la capacidad para entrar en periodos de latencia con una actividad metabólica limitada. Esta micobacteria posee una pared compleja, muy hidrófoba, con una permeabilidad reducida para un gran número de compuestos, lo cual dificulta la acción de los antimicobacterianos. Existen poblaciones de bacilos diferentes en función de su localización y actividad. Así los bacilos presentes en las cavidades pulmonares se multiplican de forma activa en un ambiente aerobio; los bacilos del interior de los macrófagos lo hacen en un ambiente microaerófilico que induce la latencia, y los que se encuentran en el interior del granuloma tienen sólo un ciclo replicativo. Los fármacos antituberculosos presentan un perfil de actividad diferente frente a cada una de estas localizaciones y poblaciones (Coll, 2003).

El objetivo del tratamiento es la cura del paciente, restaurar su calidad de vida y productividad laboral, así como prevenir una recaída, secuelas físicas a largo plazo y la muerte. Un tratamiento eficiente contra la tuberculosis reduce el riesgo de transmisión y previene la aparición de cepas resistentes (Regazzi *et al.*, 2014). Durante el tratamiento de la tuberculosis se usan múltiples fármacos para los cuales el organismo es susceptible, al usarse dos o más fármacos previenen que el bacilo genere resistencia a los otros. La tuberculosis es generalmente tratada con 4 agentes antimicobacterianos, que son isoniazida (INH), rifampicina (RIF), etambutol (EMB) y pirazinamida (PZA) (TexBookofBacteriology.net). El tratamiento es eficaz en un 95% de los casos no complicados, por una parte gracias a la asociación de estos 4 fármacos y por otra a su larga duración, la cual es de 6 meses. No todas las personas infectadas con *M. tuberculosis* desarrollan la enfermedad; existen dos condiciones para ello: personas con infección latente y personas que presentan la enfermedad (TB activa), en ambas condiciones los pacientes deben ser tratados. En personas con infección latente el tratamiento es mucho más fácil, los medicamentos usados son INH, RIF y rifampentina (CDC, 2015). En personas con tuberculosis activa los más comúnmente usados para el tratamiento de TB son: RIF, INH, PZA y EMB (Coll, 2003 y OMS, 2014). Estos fármacos son considerados fármacos de primera línea para el tratamiento de la tuberculosis.

2.2.2.1 Antimicobacterianos de primera línea

La INH es un fármaco sintético introducido en terapéutica en 1952, los miembros del complejo tuberculoso son usualmente muy sensibles a este fármaco (Coll, 2003). INH es un profármaco que requiere una activación *in vivo* llevada cabo por la enzima catalasa peroxidasa codificada por el gen *katG* (Shehzad *et al.*, 2013) que produce un potente derivado, capaz de oxidar o acilar los grupos proteicos y actúa bloqueando la síntesis de los ácidos micólicos de la pared del bacilo (Coll, 2003).

La RIF presenta un grupo aminometilpiperacina en la posición 3, es un antimicrobiano semisintético introducido en la terapéutica en el año 1967. Es un potente inhibidor de la síntesis de RNA mensajero, y por lo tanto, de la transcripción genética al unirse a la subunidad beta de la polimerasa de RNA. La RIF también posee una excelente acción esterilizante de las bacterias en estado de latencia, tanto en los focos necróticos como en el interior de los macrófagos (Coll, 2003). La RIF es un inductor de la uridina difosfato glucosiltransferasa (UGT) y de adenosina trifosfato (ATP) uniéndose a la glicoproteína transportadora de ATP (Regazzi *et al.*, 2014).

La PZA derivado sintético de la nicotinamida, es un profármaco que se difunde pasivamente al interior de los macrófagos donde es convertida a su forma activa por la enzima micobacteriana pirazinamidasa en ácido pirazinoico. El ácido pirazinoico se acumula intracelularmente por un sistema ineficiente de bombeo, este ácido actúa sobre su diana, una enzima implicada en la síntesis de ácidos micólicos, directamente porque disminuye el pH intracelular por debajo de los límites tolerados por esta enzima. Gracias a esto, posee un efecto esterilizante sobre los bacilos tuberculosos latentes en el interior de los macrófagos, pues permite acortar la duración del tratamiento a 6 meses cuando se usa asociada con RIF. La PZA carece de actividad frente a las demás micobacterias, incluyendo a otros miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (Coll, 2003). Actúa preferencialmente contra micobacterias no replicativas con un metabolismo bajo y en un pH ácido *in vitro* o *in vivo* durante la inflamación activa (Shi *et al.*, 2011). Además este fármaco contribuye a la respuesta inmune de las células del hospedero disminuyendo citosinas proinflamatorias como TNF- α e IL-6 e induciendo la autofagia en las células infectadas (Maeurer y Zumla, 2014).

El EMB (etilen-diamino-dibutanol) es un producto isómero dextrógiro derivado de la etilendiamina, que es activo frente a *M. tuberculosis* y tiene una actividad variable frente a las demás especies de micobacterias de crecimiento lento. El EMB tiene una actividad menor en las especies de crecimiento rápido. Este fármaco inhibe de forma específica la biosíntesis de la pared micobacteriana a través de un mecanismo sintético que inhibe la arabinosil transferasa, la cual participa en la biosíntesis de la pared celular (Coll, 2003; Shehzad *et al.*, 2013), es un agente bacteriostático activo para el bacilo en crecimiento, pero no presenta un efecto sobre bacilos en estado no replicativo (Shehzad *et al.*, 2013).

2.2.2.2 Antimicobacterianos de segunda línea

Los fármacos de segunda línea constituyen alternativas terapéuticas en determinadas situaciones, pero tienen altos costos y toxicidad (Coll, 2003 y Becerril-Montes *et al.*, 2013). Los fármacos de segunda línea se encuentran en los grupos 2 al 5, según la clasificación de la OMS (msfaccess.org) (Tabla 1).

Tabla 1. Grupos de fármacos usados para el tratamiento de la tuberculosis

Grupos	Medicamentos
Grupo 1. Agentes orales de primera línea	Isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida
Grupo 2. Agentes Inyectables	Amikacina, kanamicina, capreomicina
Grupo 3. Fluoroquinolonas	Gatifloxacina, moxifloxacina, levofloxacina, ofloxacina
Grupo 4. Agentes orales bacteriostáticos de segunda línea	Etionamida, protionamida, cicloserina, terizidona, ácido para-aminosalicílico (PAS)
Grupo 5. Agentes con una eficacia poco clara	Clofazimina, linezolid, amoxicilina/clavulanato, claritromicina, imipenem, tioacetazona

Adaptado de www.msfaccess.org

2.3 Resistencia a antimicobacterianos

Cuando se da una mala prescripción/administración o se abusa de los fármacos puede ocurrir resistencia en *M. tuberculosis*. Se considera tuberculosis multifármacorresistente (TB-MFR) aquella que es resistente al menos a los dos antimicobacterianos de primera línea: INH y RIF. La tuberculosis con resistencia extendida es aquella que es resistente a INH, RIF y además a por lo menos un medicamento de segunda línea del grupo 3 (TexBookofBacteriology.net).

El tratamiento de TB-MFR puede requerir de dos años con antimicobacterianos de segunda línea, que son más tóxicos y cien veces más caros que los antimicobacterianos de primera línea. Además, si estos antimicobacterianos de segunda línea son administrados inapropiadamente en pacientes con TB-MFR podría ocurrir tuberculosis extendida (LoBue, 2009). La OMS reporta que se han encontrado casos de TB-MFR en más de 45 países y se estima que 50 millones de personas alrededor del mundo se encuentran infectadas con una cepa resistente al menos a un antimicobacteriano de primera línea (Hillemann et al., 2009; Zazueta-Beltrán *et al.*, 2013). La TB-MFR es un problema que ha ido aumentando, se estima que 480,000 nuevos casos fueron diagnosticados en 2013. Existe un alto rango de mortalidad entre la población no diagnosticada con TB-MFR y pacientes tratados con fármacos de segunda línea por su toxicidad (Maeurer y Zumla, 2014) (Figura 8).

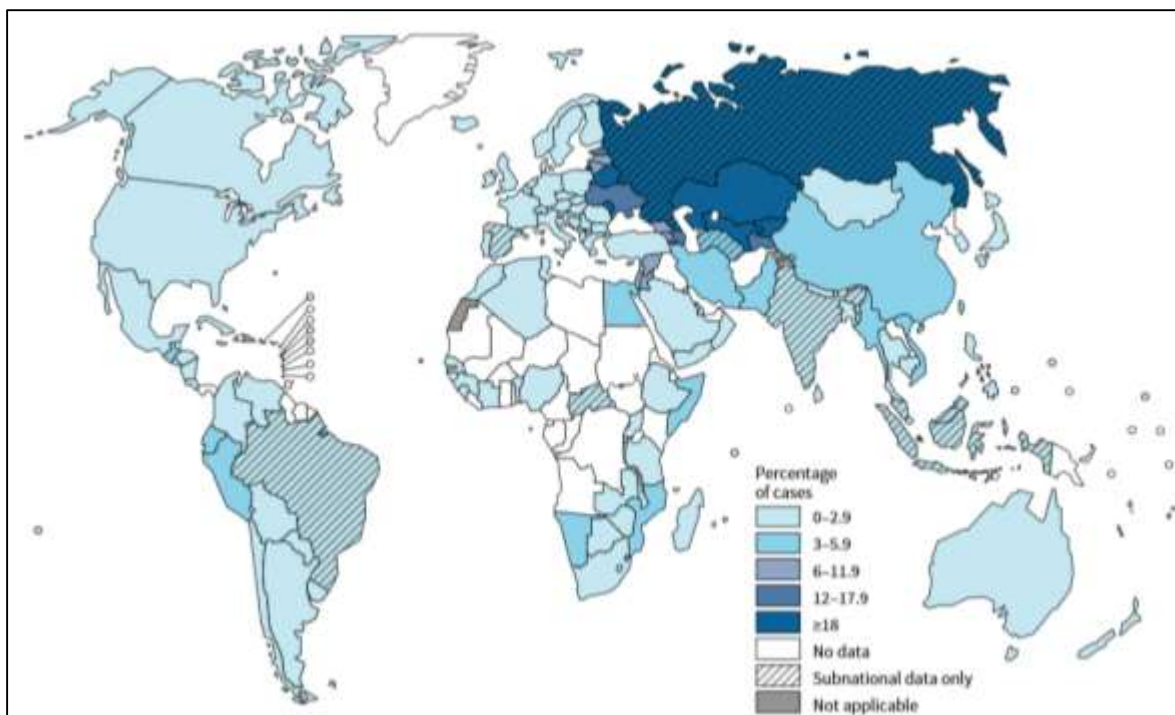


Figura 8. Incidencia mundial de TB-MFR. Casos reportados en porcentajes. OMS, 2014

La TB-MFR está asociado con un alto rango de muerte, del 50-80% en un plazo relativamente breve (Rattan *et al.*, 1998). En México, se ha reportado una incidencia de TB-MFR del 12-33%, y en el estado de Nuevo León se registró una incidencia de aproximadamente 17% de aislados clínicos en el año 2013 (Zazueta-Beltrán *et al.*, 2011; Becerril-Montes *et al.*, 2013).

El patógeno *M. tuberculosis* y otros miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis* utilizan varias estrategias para resistir la acción de agentes antimicrobianos. Primeramente, la pared micobacteriana es rodeada por una capa especializada altamente hidrófoba que disminuye la permeabilidad de muchos compuestos, activando el flujo de los fármacos y degradando o desactivando enzimas y genes que están asociados con estas funciones (Somoskovi *et al.*, 2001). Ya que la transferencia horizontal de genes no se ha demostrado en *M. tuberculosis*, la mayoría de la diversidad genética de la micobacteria ocurre como inserciones o deleciones, así como polimorfismos (Gao *et al.*,

2005). La TB-MDR resulta principalmente de la acumulación de mutaciones en genes individuales que sirven de blanco para el fármaco o genes involucrados en el metabolismo del fármaco y la probabilidad de mutación es directamente proporcional a la carga bacteriana (Rattan *et al.*, 1998)

La frecuencia de resistencia a INH es mucho más alta que en la mayoría de los fármacos antituberculosos. El reemplazar un aminoácido en el sitio de unión a NADH del gen *inh A* aparentemente resulta en la resistencia a INH, previniendo la inhibición de la biosíntesis de los ácidos micólicos (Shehzad *et al.*, 2013). Además, mutaciones en los genes *katG*, *kasA*, *ahpC* y *ndh* se han encontrado asociados con cepas resistentes en aproximadamente 60-70% (Chaoui *et al.*, 2009). Diversos estudios han demostrado que la resistencia a EMB es debida a mutaciones espontáneas que ocurren aproximadamente en 1×10^7 organismos. Las mutaciones más comunes resultan en el incremento de la producción de la enzima arabinosil transferasa que elimina los efectos inhibitorios del EMB (Shehzad *et al.*, 2013). La resistencia a RIF es debido a mutaciones en el gen *rpoB*, donde alrededor del 96% de las mutaciones son encontradas en la región de 81pb del *core* (Shehzad *et al.*, 2013). El mecanismo exacto de resistencia a PZA permanece desconocido. Aunque se ha observado que las cepas bacterianas resistentes a PZA pierden su actividad de piracinamidaza, estudios han revelado que 72-97% de los aislados clínicos resistentes tienen una mutación en algún gen estructural o en la región presuntiva del promotor del gen (Shehzad *et al.*, 2013). La mutación en el gen *pncA* que codifica para la enzima bacteriana pirazinamidasa es el principal mecanismo de resistencia a pirazinamida en *M. tuberculosis* (Shi *et al.*, 2011).

Estudios mutacionales han tratado de explicar la resistencia en aislados clínicos. Sin embargo, la detección de estas mutaciones en algunos casos no es suficiente para identificar la resistencia a fármacos, sugiriendo que existen otros mecanismos involucrados (Chaoui *et al.*, 2009; Peñuelas-Urquides *et al.*, 2013).

La variabilidad genética de las cepas puede conducir a alterar el metabolismo y las vías de expresión génica, siendo un aspecto clave en la virulencia, así como la supervivencia al estrés, transmisión, patología y mortalidad (Homolka *et al.*, 2010). Alrededor de una sexta parte de los genes de *M. tuberculosis* presentan una expresión

significativamente diferencial en distintas cepas y en las mismas condiciones. Esta variación tiene implicaciones para la patogenicidad y genes candidatos para dianas farmacéuticas (Gao *et al.*, 2005). En estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación se efectuó un análisis global comparando el perfil de expresión génica de la cepa sensible H37Rv y del aislado clínico mutifármacorresistente CIBIN:UMF:15:99 de *M. tuberculosis*. El análisis de expresión se realizó mediante microarreglos y PCR cuantitativa con el fin de identificar marcadores genéticos más específicos asociados a farmacorresistencia. Se encontró una expresión diferencial de genes entre las dos cepas: 8 genes mostraron diferencias significativas en sus niveles de expresión: *esxG*, *esxH*, *rpsA*, *esxI*, *rpmI* mostraron un incremento en su expresión en el aislado clínico MFR, mientras que los genes *lipF*, *groES* y *narG* mostraron una disminución en su expresión en este mismo aislado con respecto a la cepa de referencia H37Rv (Peñuelas-Urquides *et al.*, 2013) (Figura 9). Para confirmar estos hallazgos, se decidió evaluar a los genes diferencialmente expresados en 24 aislados clínicos de *M. tuberculosis* con diferentes perfiles de resistencia a fármacos y diferente fondo genético. De igual forma se encontró una importante diferencia en la expresión de los genes *esxH*, *infA*, *lipF* y *groES* en los aislados clínicos MFR (Figura 10). Particularmente, se observó una disminución en la expresión de *lipF* en aproximadamente el 90% de las cepas analizadas, de las cuales un 75% mostró una disminución mayor al 50% de la expresión de este gen comparado con la cepa pansensible H37Rv (Gonzalez-Escalante *et al.*, 2015).

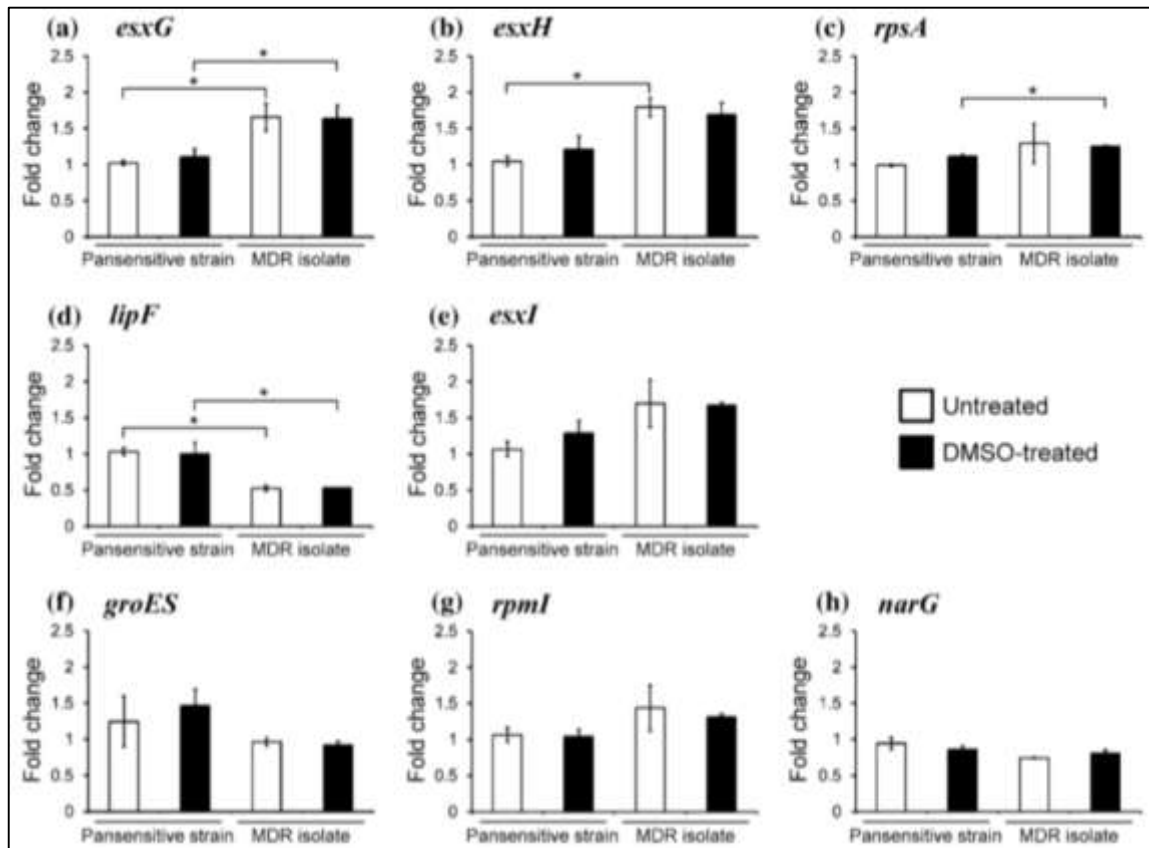


Figura 9. Expresión diferencial de genes en una cepa pansensible H37Rv (pansensitive strain) y un aislado clínico MFR (MDR isolate). Resultados obtenidos mediante RT-qPCR, en los 8 genes mostrados se encontró una expresión diferencial entre las dos cepas. Peñuelas-Urquides et al., 2013.

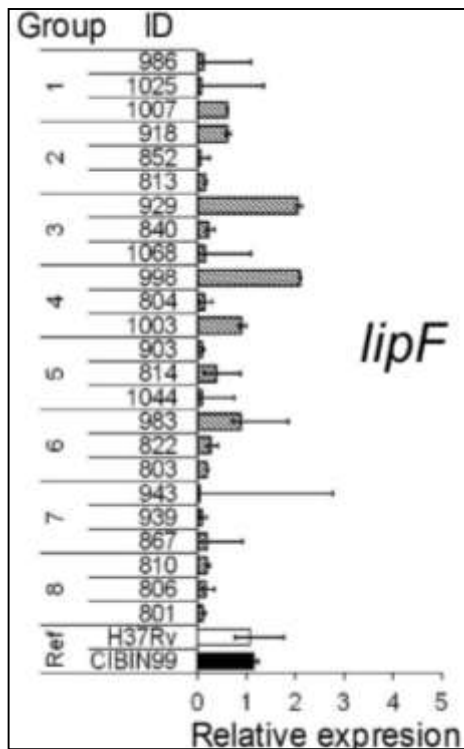


Figura 10. Expresión diferencial del gen *lipF* en aislados clínicos de *M. tuberculosis* con diferentes perfiles de resistencia a fármacos. Resultados obtenidos mediante RT-qPCR, de 8 grupos de aislados clínicos con diferente perfil de resistencia a fármacos, donde cada grupo está conformado por 3 cepas con el mismo perfil de farmacorresistencia. Se utilizó como referencia la expresión del gen *lipF* en la cepa pansensible (H37Rv) y en la MFR (CIBIN:UFM:15:99). Gonzalez-Escalante *et al.*, 2015.

2.4 Gen *lipF* de *Mycobacterium tuberculosis*

El gen *lipF* (Rv3487c) consta de 834 nucleótidos y codifica para una proteína de 277 aminoácidos con un peso molecular de alrededor de 29.4 kDa y un punto isoelectrico (pI) de 7.49 (Reddy *et al.*, 2009 y Zhang *et al.*, 2005), es una carboxilesterasa y posee también actividad de fosfolipasa C (Chen *et al.*, 2014; Srinivas *et al.*, 2008). La proteína LipF hidroliza eficientemente cadenas cortas de esteres (Zhang *et al.*, 2005). Esta proteína pertenece a la familia Lip, la cual incluye 24 hidrolasas lípido/ester llamadas de LipC a LipZ, basadas en la presencia del consenso GX SXG característica de los miembros de la familia α/β hidrolasas (Brust *et al.*, 2011). La proteína LipF contiene una hoja beta central, compuesta por seis cadenas, y está rodeada por cinco hélices ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$). La hélice $\alpha 4$ se encuentra en el dominio CAP. El sitio activo consiste en un trío catalítico de serina como el nucleófilo, histidina como el protón acarreador y aspartato /glutamato formando la red de carga y descarga (Zhang *et al.*, 2005). El gen *lipF* se ha mostrado sobreexpresado en medio ácido (pH 4.0 y 5.0), la actividad relativa de esterase incrementa al disminuir el pH alrededor de 7.5 y la actividad máxima de la enzima es a 35°C (Zhang *et al.*, 2005). Se ha reportado una proteína similar a LipF y conservada en otras especies del género *Mycobacterium*; estas son: *M. leprae*, *M. avium*, *M. abscessus*, *M. smegmatis*, *M. ulcerans*, *M. gilvum*, *M. marinum* y *M. vanbaalenii* (Reddy *et al.*, 2009).

2.4.1 Función de LipF en *M. tuberculosis*

Para que el macrófago lleve a cabo la función de eliminar al patógeno, se necesita que el fagosoma madure fusionándose con lisosomas, los cuales contienen enzimas degradativas. *M. tuberculosis* impide la maduración del fagosoma inhibiendo su fusión con el lisosoma. Esta estrategia es llevada a cabo por la adición de algunos lípidos como ceramidas y esfingosina (Russel, 2003). El fagosoma infectado experimenta una acidificación que podría sobreexpresar la expresión del gen *lipF* permitiendo al bacilo sobrevivir dentro del medio hostil y ácido del fagosoma (Ritcher *et al.*, 2007). Se ha propuesto que LipF podría modificar la pared o alterar el metabolismo de la micobacteria para resistir a condiciones de estrés ácido (Gonzales y Saviola, 2009).

Durante el estado latente, *M. tuberculosis* acumula lípidos de las células del hospedero en la forma intracelular de cuerpos de inclusión lipídicos. Este almacenaje de lípidos no sólo provee a la bacteria de energía, sino que suministra los componentes lipídicos requeridos para la síntesis de la pared micobacteriana o la membrana celular. Este evento es un aspecto importante en la patogenicidad de *M. tuberculosis*, ya que los lípidos de superficie son cruciales para la virulencia de la micobacteria. La actividad de estereasa de LipF contra los ésteres del hospedero podría proveer una fuente de ácidos grasos para la micobacteria, además de estar involucrado en la composición de la pared celular (Chen *et al.*, 2014).

Las esterasas no son expresadas en condiciones normales, son principalmente inducidas y expresadas bajo condiciones de reactivación, y por lo tanto, pueden ser usadas como biomarcadores para detectar las formas reactivadas de TB (Brust *et al.*, 2011). Además, ya que los ácidos grasos y los ácidos micólicos son constituyentes predominantes en la pared de la micobacteria, y debido a que dos de los fármacos bactericidas antituberculosis, isoniacida y etionamida, tienen como blanco inhibir el sistema FAS-II y la síntesis de grupos funcionales de ácidos grasos y micolicos (Lamichhane *et al.*, 2003), LipF podría estar involucrada en este proceso, ya que se ha reportado que podría modificar la pared celular (Rastogi *et al.*, 2015).

Por otro lado, en mamíferos, las carboxilesterasas han sido categorizadas como enzimas que metabolizan fármacos, pues tienen una función importante en la biotransformación hidrolítica de algunos fármacos y profármacos que contienen esteres, con la liberación de un alcohol sustituyente y un grupo acilo (Satoh y Hosokawa, 2006 y Xu *et al.*, 2014). Sin embargo, en micobacterias no se ha estudiado la interacción de LipF con los antimicobacterianos, pero por ser una carboxilestereasa podría tener una actividad similar a la encontrada en mamíferos.

2.5 Modelos de *Mycobacterium*

Debido al riesgo relativo alto de manipular cultivos de *M. tuberculosis*, por la generación de aerosoles y su potencial virulento y/o farmacorresistente (OMS, 2013), se han establecido cepas modelo para el estudio de este microorganismo. Se han utilizado

modelos de *Mycobacterium* como sustitutos para estudios de *M. tuberculosis* (Gonzales-y-Merchand *et al.*, 2012), donde dos de las cepas más utilizadas son *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* cepa H37Ra (no virulenta).

M. smegmatis es una micobacteria de crecimiento rápido que tiene un tiempo de generación de 3 a 4 h si es cultivada en condiciones favorables. Aunque *M. smegmatis* puede ser un patógeno oportunista, bajo condiciones controladas en el laboratorio su manipulación es segura (Gonzales-y-Merchand *et al.*, 2012). *M. smegmatis* ha sido un buen modelo para comprender la fisiología de *M. tuberculosis*. La principal cepa utilizada para este tipo de estudios es *M. smegmatis* mc² 155 (Agrawal *et al.*, 2015 y Gonzales-y-Merchand *et al.*, 2012). Esta cepa posee una enzima ADP-ribotransferasa la cual oxida al fármaco RIF, por lo que la concentración mínima inhibitoria para este fármaco es elevada. En un estudio realizado por Agrawal *et al.* (2015) observaron que podía inhibirse el crecimiento de *M. smegmatis* a concentraciones mayores de RIF. En este trabajo también se determinaron las CMI de los fármacos INH y EMB.

El gen *lipF* tiene una identidad del 68% cuando se comparan con el gen que codifica para la esterasa LipU, MSMEI_0260 de *M. smegmatis* cepa mc² 155. Para el caso de la secuencia aminoacídica de las proteínas LipF de *M. tuberculosis*, se observó una similitud del 69% cuando se comparó con la esterasa de *M. smegmatis* (NCBI, 2015).

La cepa mc² 155 ha sido ampliamente utilizada para ensayos de expresión de genes de *M. tuberculosis* debido a su nivel de bioseguridad, y a que es de fácil transformación. En esta cepa se han expresado tanto genes de virulencia, como genes que codifican para lipasas (Zheng *et al.*, 2008 Singh y Reyrat, 2009, Cao *et al.*, 2015), y también se ha utilizado en estudios de resistencia a fármacos (Agrawal *et al.*, 2015). Debido a lo anterior, en el presente proyecto nos proponemos a evaluar la relación del gen *lipF* de *M. tuberculosis* con la condición de resistencia a fármacos de primera línea en el modelo experimental *M. smegmatis*.

3. JUSTIFICACIÓN

La tuberculosis es la segunda causa de muerte por una enfermedad infecciosa afectando a un tercio de la población mundial. Esta enfermedad está presente en nuestro país, siendo el estado de Nuevo León el tercer lugar a nivel nacional en incidencia. Aunque la tuberculosis es una enfermedad muy antigua, aún es considerada un problema de salud pública debido en parte a la resistencia que se ha presentado en los últimos años a los fármacos antimicobacterianos. En México, entre un 12 y 33% de las personas que presentan tuberculosis están infectadas con una cepa farmacorresistente, provocando un rango de muerte del 50 al 80%. Por tal razón es necesaria la detección oportuna de estas cepas para brindar a los pacientes un tratamiento eficaz. La resistencia a fármacos en *M. tuberculosis* se ha vinculado a mutaciones en genes específicos, sin embargo esta condición no se cumple en todos los casos, sugiriendo que otros mecanismos pudieran estar involucrados. En estudios recientes realizados por nuestro grupo de investigación se reportó la disminución de la expresión del gen *lipF* en cepas con diferentes perfiles de resistencia y fondo genético. Por tal motivo consideramos de gran importancia evaluar el efecto de la expresión de este gen en el fenómeno de la farmacorresistencia en un modelo de *M. tuberculosis*, y de esta manera apoyar al conocimiento sobre la forma en la que estas bacterias resisten a los antimicobacterianos. También es posible que esta proteína pueda ser utilizada como un biomarcador para la detección temprana de las cepas resistentes y así implementar de manera oportuna un tratamiento eficaz disminuyendo la probabilidad de muerte de los pacientes con tuberculosis farmacorresistente.

4. HIPÓTESIS

La expresión de la proteína LipF tiene efecto en la farmacorresistencia en una cepa modelo de *Mycobacterium tuberculosis*.

5. OBJETIVO DEL TRABAJO

Objetivo General

Evaluar el efecto de la expresión de la lipasa LipF en la resistencia a fármacos de primera línea en un modelo experimental de *Mycobacterium tuberculosis*.

Objetivos particulares

1. Generar construcciones plasmídicas con la secuencia codificante del gen *lipF* en el vector micobacteriano pMV261.
2. Inducir la expresión de LipF en una cepa modelo de *Mycobacterium tuberculosis*.
3. Evaluar el efecto de la expresión de LipF con la condición de resistencia a fármacos de primera línea en una cepa modelo de *Mycobacterium tuberculosis*.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Subclonación del gen *lipF* en el vector pMV261 en *Escherichia coli*

La subclonación de la secuencia codificante del gen *lipF* se realizó en el vector pMV261 (Stover *et al*, 1991). El vector se linearizó utilizando la enzima de restricción *Bam*HI, la región codificante del gen *lipF* el cual fue liberada del vector pET-TOPO101 con esta misma enzima. Se realizó una separación de los productos digeridos mediante electroforesis en gel de agarosa a partir del cual se purificaron tanto el vector linearizado y desfosforilado, como el gen *lipF* usando el kit GENECLAN turbo (MP Biomedicals, Ohio, USA). Brevemente, por cada 0.1 g de gel se agregaron 200 µL de solución salina, y se incubó a 55 °C por 5 min homogenizando por inversión. La solución se transfirió a la columna provista en el kit y se centrifugó a velocidad máxima por 15 s; se agregaron 500 µL de solución de lavado a la muestra y ésta se centrifugó a velocidad máxima por 15 s, y después se agregaron 30 µL de la solución de elución sobre la membrana y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Una vez concluido este tiempo, la columna se centrifugó a velocidad máxima por 1 min para eluir el purificado en un nuevo microtubo. El vector pMV261 y gen *lipF* purificados se sometieron a una reacción de ligación usando una unidad de ligasa T4 utilizando la relación 1:3 (vector:inserto). La reacción se incubó 3 h a temperatura ambiente seguida de una posterior incubación a 4 °C toda la noche. Usando el producto de ligación se realizó la transformación en la cepa de *E. coli* DH5α y se seleccionaron candidatos que contenían el vector con el inserto en dirección sentido (pMV261:LipF) .

6.1.1 Caracterización de las construcciones plasmídicas

La caracterización se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación automatizada. Para realizar estos ensayos primeramente se realizó una extracción de DNA plasmídico mediante lisis alcalina utilizando una minipreparación como se menciona en la siguiente sección.

Para comprobar que las construcciones contaban con el inserto del gen se caracterizaron mediante PCR utilizando los *primers* forward y reverse de LipF (Tabla 2) con las condiciones previamente estandarizadas (Joyce Rigal, 2015). La mezcla de reacción contenía lo siguiente: Taq DNA polymerase buffer 1×, dNTPs 2 mM, MgCl₂

3.5 mM, DMSO 5% y una unidad de *Taq* DNA polimerasa. El programa utilizado para la amplificación consistió en un solo paso de desnaturalización a 95°C por 5 min, 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineamiento a 57 °C por 30 s, y extensión a 72°C por 30 s, y un paso final de extensión a 72°C por 5 min.

La identificación de la orientación del inserto se realizó mediante PCR y secuenciación. Para la PCR se utilizaron combinaciones de los *primers* pMV261-F, LipF-F y LiF-R (Tabla 2) y las condiciones finales después de la estandarización fueron las siguientes: buffer Taq 1×, dNTPs 2 mM, MgCl₂ 1.5 mM y una unidad de *Taq* DNA polimerasa. El programa utilizado para la amplificación consistió en un paso de desnaturalización 95 °C por 5 min, 25 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 s, de alineamiento a 62 °C por 30 s, y de extensión a 72 °C por 30 s, y un paso final de extensión a 72 °C por 7 min. Los productos de amplificación fueron separados y visualizados usando electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con Gel Red Nucleic Acid (Biotium, California, USA) y fotodocumentadas utilizando el equipo Multidoc-it digital imaging system (UVP, California, USA). La secuenciación se realizó usando como templado al DNA plásmidico purificado de las construcciones de interés y los *primers* LipF internos *forward* y *reverse* (Tabla 2). La secuenciación se realizó por la empresa MACROGEN USA y los resultados obtenidos fueron analizados usando un alineamiento BLAST con la base de datos del NCBI, y los programas CLC sequence viewer 7 y SeqScape V2.7 utilizando las siguientes secuencias de referencia: Carboxilesterasa LipF (NC_000962.3), construcción *in silico* pMV261-LipF (SnapGene) y la secuencia del vector pMV261 (Stover *et al*, 1991).

Tabla 2. Secuencias nucleótídicas de *primers* específicos para LipF y el vector pMV261.

Nombre	Orientación	Secuencia (5'- 3')	Temperatura media de alineación (T _m)
LipF Int-F	Forward	CAG TGC GAC GAC GAG AAA	55.2 °C
LipF Int-R	Reverse	AAA CGT GAA TAA GTG TCG GC	53.4 °C
LipF-F (ATG)	Forward	CACCGGATCCAATGCGTGCGCCTGGGGTG	88.5 °C
LipF-R	Reverse	GGATCCCTAGATAGGCGACCTGTCCAAAC	72.2 °C
pMV261-F	Forward	GTTGTAGTGCTTGTGGTGGCA	58.1 °C
pMV261-R	Reverse	ACGGACGGCTCAAGTTGTC	57.7 °C

Diseñados por R. Robles, J. Rigal y A.L. Granados

6.1.1.1 Extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina

Brevemente, un cultivo de 3 mL de los candidatos seleccionados crecidos por 24 h a 37 °C con agitación constante en medio Luria Bertani (LB) se centrifugó para obtener una pastilla de células. La pastilla se lavó con STE y se resuspendió en buffer de lisis alcalina I, secuencialmente se agregó solución de lisis alcalina II y solución de lisis alcalina III mezclando por inversión. La muestra se incubó en hielo de 3 a 5 min y se centrifugó a velocidad máxima por 5 min. El sobrenadante se recuperó y se agregó un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y se mezcló en vortex. La muestra se centrifugó a velocidad máxima durante dos minutos y se tomó la fase acuosa, la cual se precipitó usando 2 volúmenes de etanol absoluto, se centrifugó para obtener la pastilla y se realizó un lavado con etanol al 70 %. Finalmente la pastilla se resuspendió en TE 1×. El DNA obtenido se cuantificó usando Nanodrop 2000 y se observó su integridad por su separación por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con Gel Red Nucleic Acid (Biotium) y observadas usando el fotodocumentador multidoc-it digital imaging system (UVP).

6.1.2 Purificación del DNA de las construcciones plasmídicas

Una vez identificados los candidatos, las bacterias transformadas se crecieron en un volumen de 100 mL de caldo LB conteniendo 75 µg/mL de kanamicina y el DNA plasmídico se purificó utilizando el kit Pureyield Plasmid Midiprep System (Promega, Wisconsin, USA). Brevemente, se resuspendieron las células en una solución fisiológica, y después se agregó la solución de lisis celular mezclando por inversión. La

mezcla se incubó a temperatura ambiente, posteriormente se agregó la solución de neutralización y se centrifugó durante 15 minutos a 15,000 g, se pasó el sobrenadante por la columna y se agregó la solución de lavado para la remoción de endotoxinas bacterianas. Una vez que se pasó por la columna, se agregó la solución de lavado de la columna y el DNA plásmidico se obtuvo usando la solución de elución, y centrifugando a 2,000 g por 5 min. El plásmido purificado se cuantificó por espectrofotometría y se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa teñido con Gel Red Nucleic Acid (Biotium).

6.2 Cultivo y mantenimiento de *M. smegmatis*

La cepa mc²155 de *M. smegmatis* (ATCC 700084) se reactivó usando medio 7H9 suplementado con 10 % de albumina bovina, dextrosa, catalasa (ADC) y 0.05% de Tween 80. La cepa se incubó a 37 °C con agitación constante durante 24 h, y después se resembró un inóculo en medio 7H9 (con 10% ADC y 0.05% Tween 80) y en medio sólido 7H10 (suplementado con 10% de OADC). Los cultivos se incubaron a 37 °C durante 24 h, posteriormente una porción de los cultivos en medio sólido se colocaron en medio de preservación (7H9 adicionado con 10% ADC y 45% glicerol) y se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

6.3 Caracterización de la cepa mc²155 de *M. smegmatis*

Para confirmar las características morfológicas de la cepa, se realizó una tinción Ziehl-Neelsen utilizando el procedimiento convencional. Brevemente, se realizó una preparación de la cepa tomando una porción de una colonia, y esta se extendió en un portaobjetos con una gota de agua, la cual se secó al aire y se fijó al calor. Posteriormente, se colocó el portaobjetos sobre una tela de asbesto en un tripie y se cubrió la preparación con carbolfushina de Ziehl-Neelsen. La preparación se calentó por 3 min con mechero a fuego lento, evitando que el colorante llegara a su punto de ebullición y manteniendo la preparación húmeda. Transcurrido el tiempo, la preparación se lavó con agua y se decoloró utilizando alcohol ácido durante 20 s. Posteriormente, la preparación se lavó con agua destilada para eliminar el exceso de alcohol ácido y, por último, se aplicó el colorante de contraste azul de metileno durante un minuto. La

preparación se lavó con agua destilada para eliminar el exceso de colorante y se observó al microscopio con el objetivo 100×.

Además, se observó morfología colonial de la cepa mc²155 de *Mycobacterium smegmatis* en medio sólido 7H10 suplementado con 10% OADC.

6.3.1 Curva de crecimiento de *M. smegmatis*

Se realizó una curva de crecimiento en un volumen de 1 mL de medio 7H9 adicionado con 10% ADC y 0.05% Tween 80 utilizando como inóculo 10 µL de cultivo en crecimiento exponencial. Se tomaron lecturas en unidades McFarland utilizando el equipo DensiCHEK™ plus VITEK (BIOMERIEUX, Marcy-l'Étoile, Francia) a las 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 27 y 30 h. Los resultados fueron procesados y graficados usando el programa Excel 2013.

6.3.2 Comparación de unidades de McFarland con densidad óptica y Unidades Formadoras de Colonias por mililitro en *M. smegmatis*

Se realizó un cultivo en un volumen de 10 mL de medio 7H9 adicionado con 10 % ADC y 0.05 % Tween 80. Como inóculo se utilizaron 100µL de un cultivo en fase exponencial y se incubó a 37 °C durante 24 h con agitación constante, se ajustó el cultivo en tubos de 13x100 mm a las unidades de McFarland, 0.43, 0.45, 1.11, 1.24, 2.29 y 2.46. Los cultivos fueron inactivados con formaldehído al 10 % y se midió densidad óptica usando el espectrofotómetro Genesys 20 (THERMO FISHER SCIENTIFIC, Massachusetts, USA), los datos se graficaron y se obtuvo la ecuación de la recta.

Además, se realizó la comparación de las unidades de McFarland con unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL), para lo cual se utilizó un cultivo a 1.11 unidades de McFarland. Se realizaron diluciones seriadas para sembrar en agar 7H10 adicionado con 10% OADC, se sembró un volumen de 100 µL de las diluciones (1×10^{-5} , 1×10^{-6}), y se incubaron a 37°C durante 3 días para observar a las colonias características y realizar su conteo.

6.4 Expresión de LipF en *M. smegmatis*

El plásmido pMV261:LipF fue transformado en *M. smegmatis* (ATCC 700084, cepa mc²155) mediante electroporación, para lo cual los cultivos micobacterianos fueron crecidos en medio 7H9 adicionado con 10 % de ADC y 0.05 % de Tween 80 hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento. Los cultivos se centrifugaron y se resuspendieron en agua libre de nucleasas conteniendo 10 % de glicerol y se sometieron a electroporación en presencia de los plásmidos recombinantes con LipF mediante un pulso de 2.5 kV, 1000 Ohms, 25 μ FD. Posteriormente, las micobacterias se resuspendieron en medio 7H9 más 10 % ADC y se incubaron a 37 °C por 2 h; el cultivo se sembró en medio 7H10 adicionado con 10 % de OADC conteniendo el fármaco de selección (kanamicina 75 μ g/mL) y se incubó a 37 °C durante 3 días o hasta observar las colonias características.

6.5 Evaluación de la expresión de LipF en la condición de resistencia a fármacos en *M. smegmatis*

La evaluación de la sobreexpresión de LipF en la condición de resistencia a fármacos en *Mycobacterium* se realizó mediante el método de microdilución en placa con el compuesto rezasurina, por cinéticas de crecimiento, y un ensayo RT-PCR punto final. Para lo anterior se realizaron cultivos de *M. smegmatis* en ausencia y presencia del vector pMV261:LipF, así como en ausencia y presencia de los fármacos de primera línea.

6.5.1 Actividad de fármacos de primera línea en las cepas de micobacterias con expresión de LipF mediante el método de microdilución en placa con el compuesto rezasurina

La actividad *in vitro* de los fármacos de primera línea fueron evaluados en cepas de *M. smegmatis* transformadas con pMV261:LipF utilizando el método de microdilución en placa con el compuesto rezasurina (Martin y Palomino, 2012 y Agrawal *et al.*, 2015). Brevemente, en una placa de 96 pozos conteniendo 50 μ L de medio 7H9 adicionado con ADC se realizaron diluciones seriales de cada uno de los fármacos de primera línea para evaluar un rango de concentraciones específico para cada

uno de ellos (Tabla 3) en un volumen final de 100 μ L. El inóculo de cada uno de los pozos se realizó a partir de un cultivo en fase logarítmica de crecimiento (2.7 McFarland, equivalente a 0.6 DO), el cual fue diluido en una relación 1:1,000, se colocaron 50 μ L de inóculo en cada uno de los pozos. Como control de viabilidad se utilizó medio de cultivo sin fármacos; y en el caso de pirazinamida, el medio de cultivo se ajustó a un pH de 5.5. La placa fue incubada a 37 °C con agitación constante durante 40 h. Posteriormente, se agregaron 30 μ L de resazurina (0.2 mg/mL) a cada pozo y se incubó la placa por 6 h más bajo las mismas condiciones. Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) se determinaron mediante el cambio de coloración del compuesto resazurina. Cuando se observa un cambio de color azul a rosa significa que hay crecimiento bacteriano. El ensayo se realizó por triplicado para cada una de las condiciones evaluadas.

Tabla 3. Rango de concentración de los fármacos en el método de microdilución en placa para *M. smegmatis*.

Fármaco	Abreviatura	Rangos de concentración (μg/mL)
Isoniazida	INH	256 – 0.25
Rifampicina	RIF	50 – 0.05
Etambutol	EMB	8 – 0.05
Pirazinamida	PZA	200 – 0.20

Adaptado de Agrawal *et al.*, 2015).

6.5.2 Cinéticas de crecimiento de *M. smegmatis* con el fármaco RIF

Las cinéticas de crecimiento de *Mycobacterium* se llevaron a cabo en cultivos líquidos con medio 7H9 complementado con 10% de ADC. Brevemente, se activaron las cepas de *M. smegmatis*, *M. smegmatis* pMV261 y *M. smegmatis* expresando LipF (pMV261-LipF) y se ajustaron al estándar 1 de McFarland; se sembraron 10 μ L del cultivo en un volumen de 1 mL de 7H9 más 10% de ADC con 20 μ g/mL de kanamicina y con las

concentraciones de RIF de 3.12, 1.6 y 0.8 µg/mL, Se incubaron a 37°C en agitación constante, tomándose lecturas cada 3 h durante 27 h, monitoreando el crecimiento micobacteriano en unidades de McFarland usando el equipo DensiCHEK™ plus VITEK (BIOMERIEUX).

6.5.3. RT-PCR punto final

Con la finalidad de observar si las micobacterias transformadas expresan el plásmido pMV261:LipF, se realizó la amplificación por RT-PCR punto final del gen *lipF*. A partir de cultivos en medio líquido de *M. smegmatis* transformada con el vector pMV261:LipF se extrajo el RNA total como se menciona en la sección *Extracción de RNA de M. smegmatis*. El RNA fue tratado con la enzima DNasa I para digerir el DNA genómico presente en la muestra, se utilizó una muestra sin DNasaI como control. Se llevó a cabo la síntesis de cDNA utilizando la enzima transcriptasa reversa M-MLV y hexámeros aleatorios (Invitrogen, Carlsbad, CA. USA) siguiendo las instrucciones del proveedor. El cDNA obtenido se utilizó para los ensayos de PCR punto final usando los *primers* LipF-F y LipF-R para demostrar la expresión del gen *lipF* en la cepa.

6.5.3.1. Extracción de RNA de *M. smegmatis*

Un cultivo micobacteriano de 10 mL se centrifugó, y el medio de cultivo se desechó para obtener el RNA total a partir de la pastilla celular de acuerdo a las instrucciones provistas en el reactivo TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA). La pastilla micobacteriana se resuspendió en 800 µL del reactivo TRIzol, y se adicionó cloroformo y se centrifugó la muestra transfiriendo el sobrenadante para la posterior precipitación del RNA utilizando isopropanol y un lavado con etanol al 70 %. La cuantificación y pureza del RNA total aislado se determinó por espectrofotometría con luz UV y la integridad se observó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 % teñidos Gel Red Nucleic Acid (Biotium). El RNA total se almacenó a -70 °C hasta su utilización.

6.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante la comparación de las pendientes de la recta en las curvas de crecimiento. Se compararon las pendientes obtenidas de las curvas

de crecimiento con las diferentes concentraciones de RIF de las dos cepas de *M. smegmatis* (expresando *lipF* y la cepa que no lo expresa). Para este análisis los valores se consideraron significativos cuando la $P < 0.05$ y altamente significativos cuando la $P < 0.01$.

7. RESULTADOS

7.1 Subclonación del gen *lipF* en el vector pMV261 en *Escherichia coli*

Con la finalidad de subclonar el gen *lipF* en un vector específico de micobacterias, la secuencia codificante de *lipF* se obtuvo a partir de la construcción en un vector de transición, y por otro lado se linearizó al vector pMV261 (específico de micobacterias) mediante digestión enzimática utilizando la enzima *Bam*HI. El producto de la digestión enzimática se separó mediante electroforesis en un gel de agarosa, observándose una banda de aproximadamente 800 pb correspondientes al gen *lipF* así como una banda correspondiente al vector linearizado de aproximadamente 4,000 pb (Figura 11). Estos fragmentos fueron purificados mediante el uso de un kit comercial y se observó un patrón de bandas intensas correspondientes a la recuperación de los productos purificados íntegros (Figura 12). Posteriormente, se realizó la reacción de ligación de ambos productos purificados, y la reacción de ligación completa se transformó en una cepa de *E. coli* DH5 α , obteniéndose 50 candidatos de los cuales se aislaron 5, a estos, se les realizó extracción de DNA plasmídico (Figura 13). Usando como templado el DNA plasmídico de estos candidatos, se realizó un ensayo de PCR con *primers* específicos para *lipF* (LipF-F y LipF-R, tabla 2) y se obtuvieron amplicones de aproximadamente 800 pb en todos los candidatos, incluyendo la amplificación del control positivo (Figura 14).

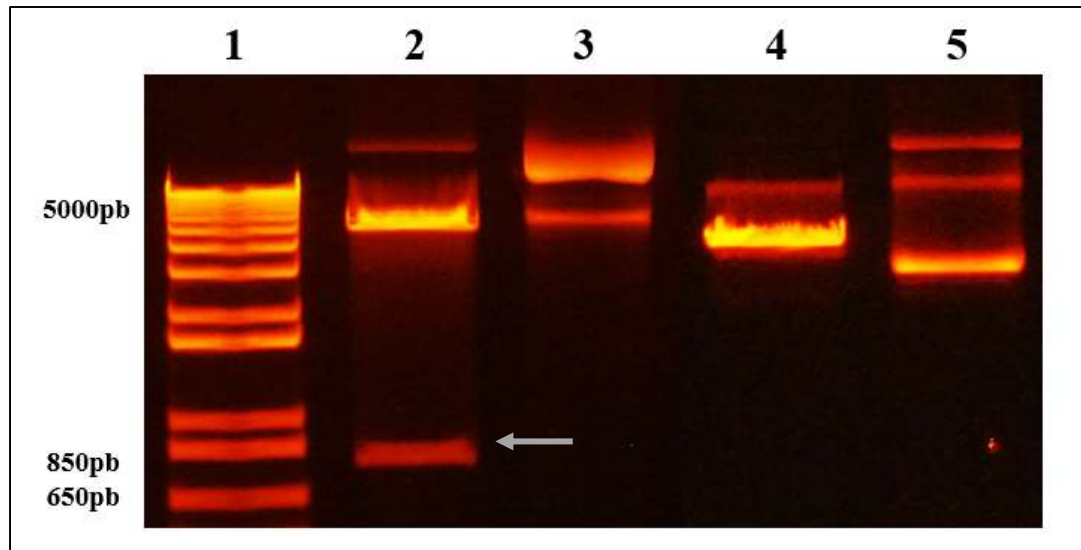


Figura 11. Digestión de los vectores LipF-TOPO y pMV261 usando la enzima *Bam*HI. Carril 1) Marcador de peso molecular 1Kb plus, carril 2) LipF-TOPO digerido, carril 3) LipF-TOPO control sin digerir, carril 4) pMV261 digerido, carril 5) pMV261 control sin digerir. La flecha señala el producto correspondiente al gen *lipF*.

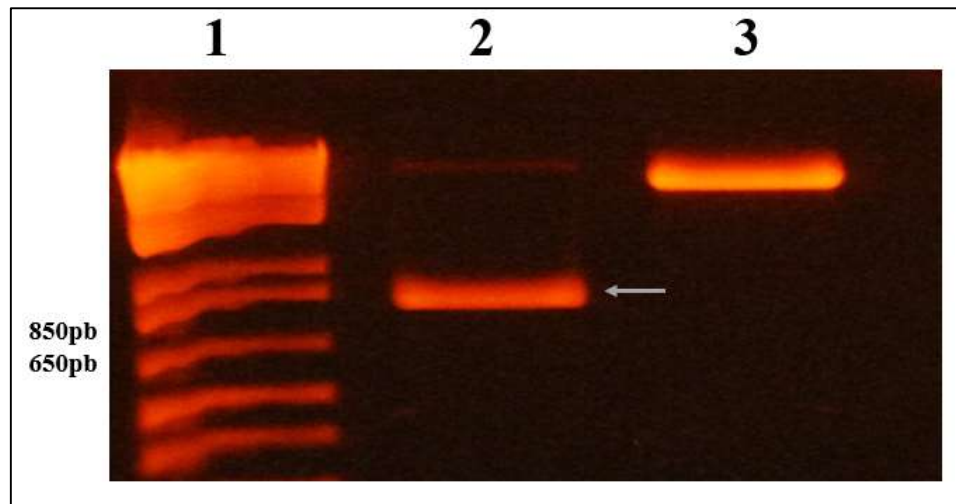


Figura 12. Purificación del fragmento del gen *lipF* y del vector linearizado pMV261. Carril 1) Marcador de peso molecular 1Kb plus, carril 2) Gen *lipF*, carril 3) pMV261 linearizado y desfosforilado. Productos purificados usando el kit GeneClean. La flecha señala el producto correspondiente al gen *lipF*.

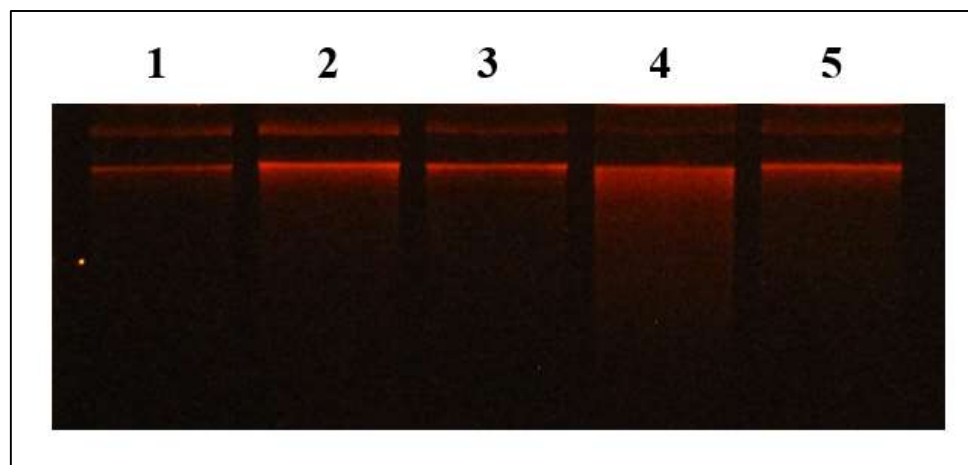


Figura 13. Extracción de DNA plasmídico de los candidatos de la construcción pMV261-LipF. Carriles 1 a 5 representan a los candidatos correspondientes del 1 al 5.

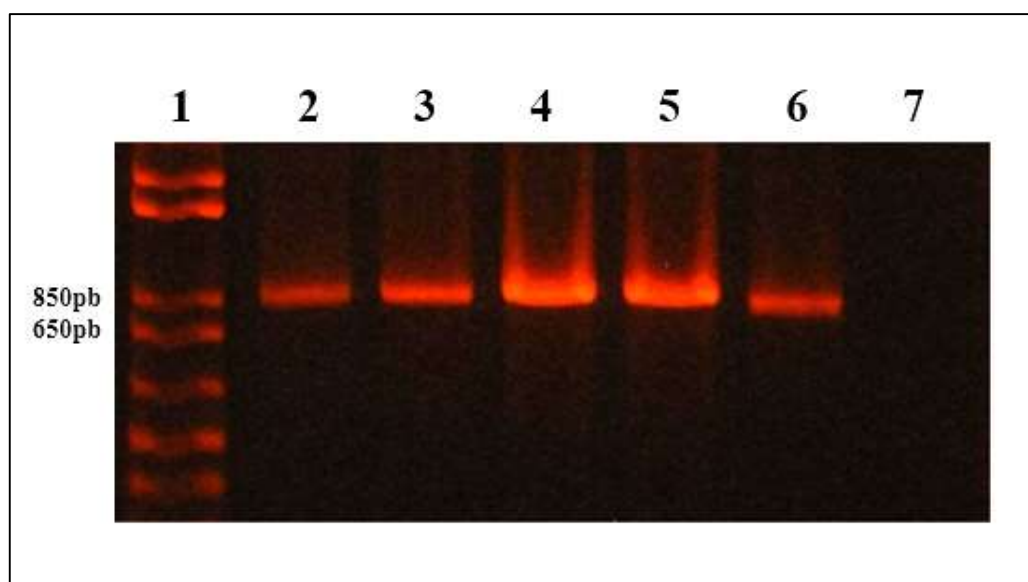


Figura 14. Amplificación del gen *lipF* a partir de los candidatos de la construcción pMV261-LipF mediante PCR. Carril 1) Marcador de peso molecular 1 kb plus, carril 2) candidato 1, carril 3) candidato 2, carril 4) candidato 3, carril 5) candidato 4, carril 6) Control positivo de amplificación (Construcción LipF-Topo), carril 7) Control Negativo.

7.1.1 Caracterización y purificación de las construcciones plasmídicas

Se caracterizaron las construcciones plasmídicas mediante PCR observándose un amplicón de aproximadamente 1,600 pb para la combinación de los *primers* pMV261-F y LipF-R (Tabla 2) en el candidato 4, y un amplicón de un tamaño similar para el

candidato 1 pero con la combinación de *primers* pMV261-F y LipF-F (Tabla 2, Figura 15). Con la finalidad de confirmar el sentido del gen *lipF* en el plásmido, se secuenciaron estos candidatos usando los *primers* internos de *lipF* (LipF Int-F y LipF Int-R, tabla 2). Se obtuvo una secuencia de aproximadamente 1,000 pb la cual se alineó con la construcción *in silico* de pMV261-LipF. La secuencia obtenida alineo con la correspondiente a la secuencia codificante de *lipF* y una parte del vector. Se localizó el sitio de inicio de la traducción (ATG) y un marco abierto de lectura que concluía con el codón de paro reportado para *lipF* (TAG) (Figura 16). No se encontraron mutaciones en la secuencia codificante del gen *lipF* (Figura 17). Además, con la secuenciación se logró determinar la orientación del gen: el candidato 1 se encontró subclonado en dirección antisentido y el candidato 4 en dirección sentido (Figura 18). Una vez caracterizadas las construcciones se procedió a la purificación de las mismas observándose una excelente integridad para ambas construcciones (pMV261-LipF y pMV261-LipF-R), con una concentración de aproximadamente 60 ng/μL y una pureza de 1.9 en la relación 260/280 nm (Figura 19).

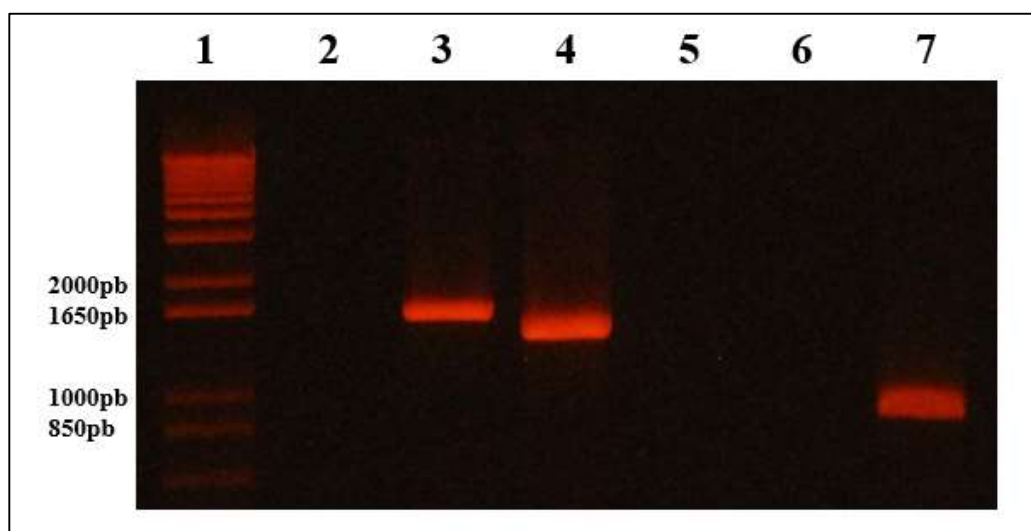


Figura 15. Caracterización de las construcciones pMV261-LipF mediante PCR usando combinaciones de los *primers* LipF-F, LipF-R y pMV261-F. Carril 1) Marcador de peso molecular 1Kb plus, Carril 2) Candidato 4 usando *primers* pMV261-F y LipF-F, Carril 3) Candidato 4 usando *primers* pMV261-F y LipF-R, carril 4) Candidato 1 usando *primers* pMV261-F y LipF-F, Carril 5) Candidato 1 usando *primers* pMV261-F y LipF-R, Carril 6)

Control negativo, Carril 7) Control positivo (usando como template DNA plasmídico del candidato 4 y *primers* LipF-F y LipF-R).

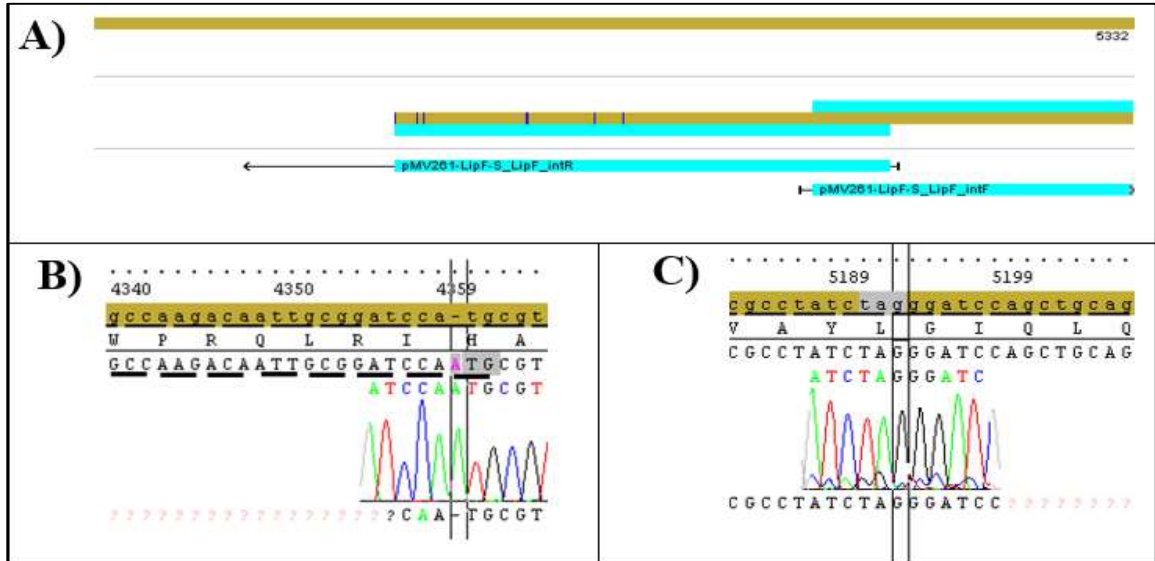


Figura 16. Secuenciación automatizada de la construcción pMV261-LipF usando los *primers* internos de LipF. A) Mapa general de la secuenciación comparado con la referencia (construcción obtenida con el programa SerialCloner de la construcción pMV261-LipF). En azul se muestra la región de la secuencia obtenida con cada uno de los *primers* y las flechas indican la dirección de la secuencia con cada uno de los *primers* utilizados. B) Electroferograma del sitio de inicio de la transcripción del gen *lipF* y marco de lectura abierto resaltado en color gris. C) Electroferograma incluyendo el codón de paro del gen *lipF* marcado en color gris.

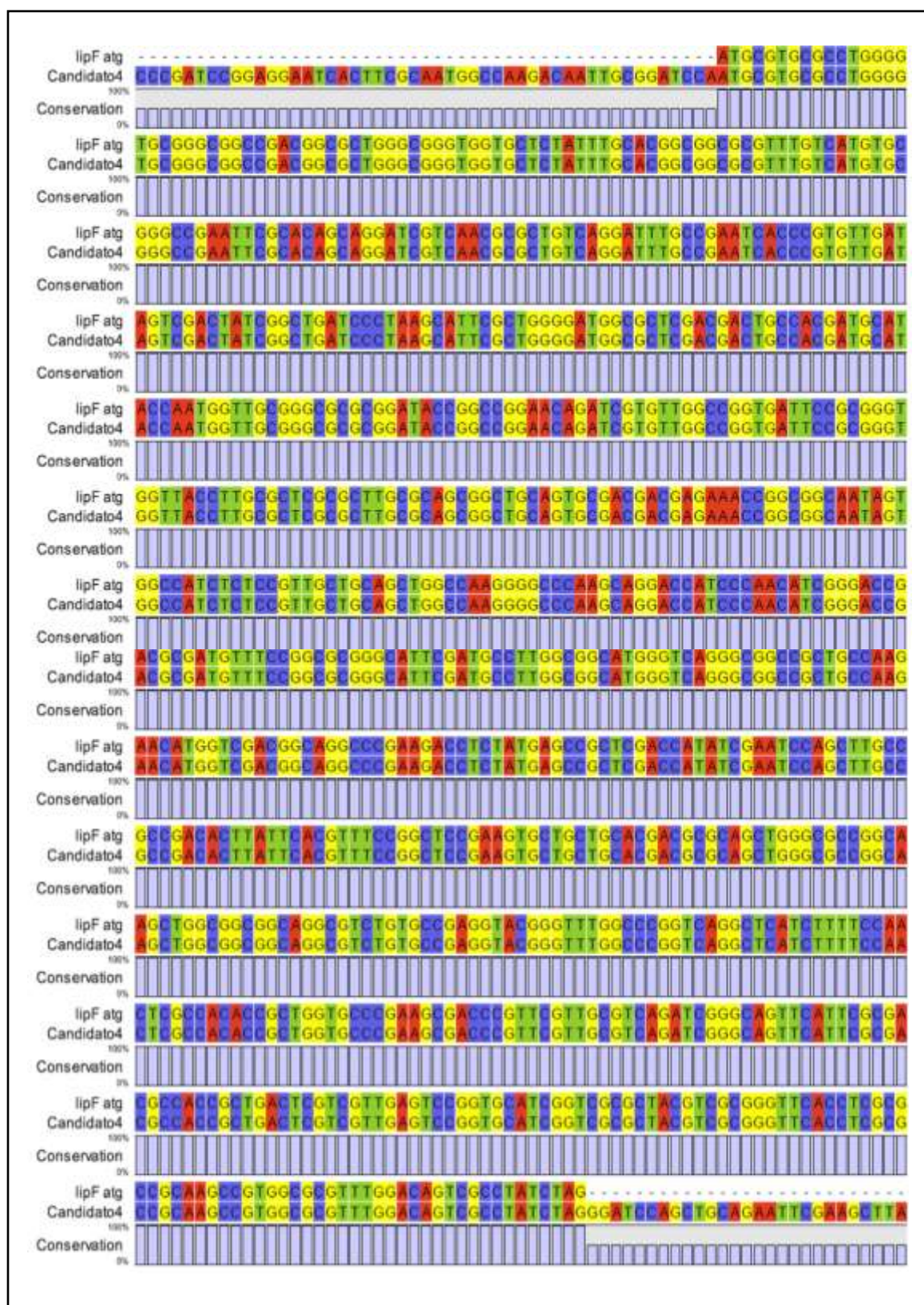


Figura 17. Alineamiento de la secuencia del candidato 4 con la secuencia de referencia del gen *lipF* (NCBI, No. Acceso 000962.3) Datos analizados en el programa CLC sequence viewer 7.

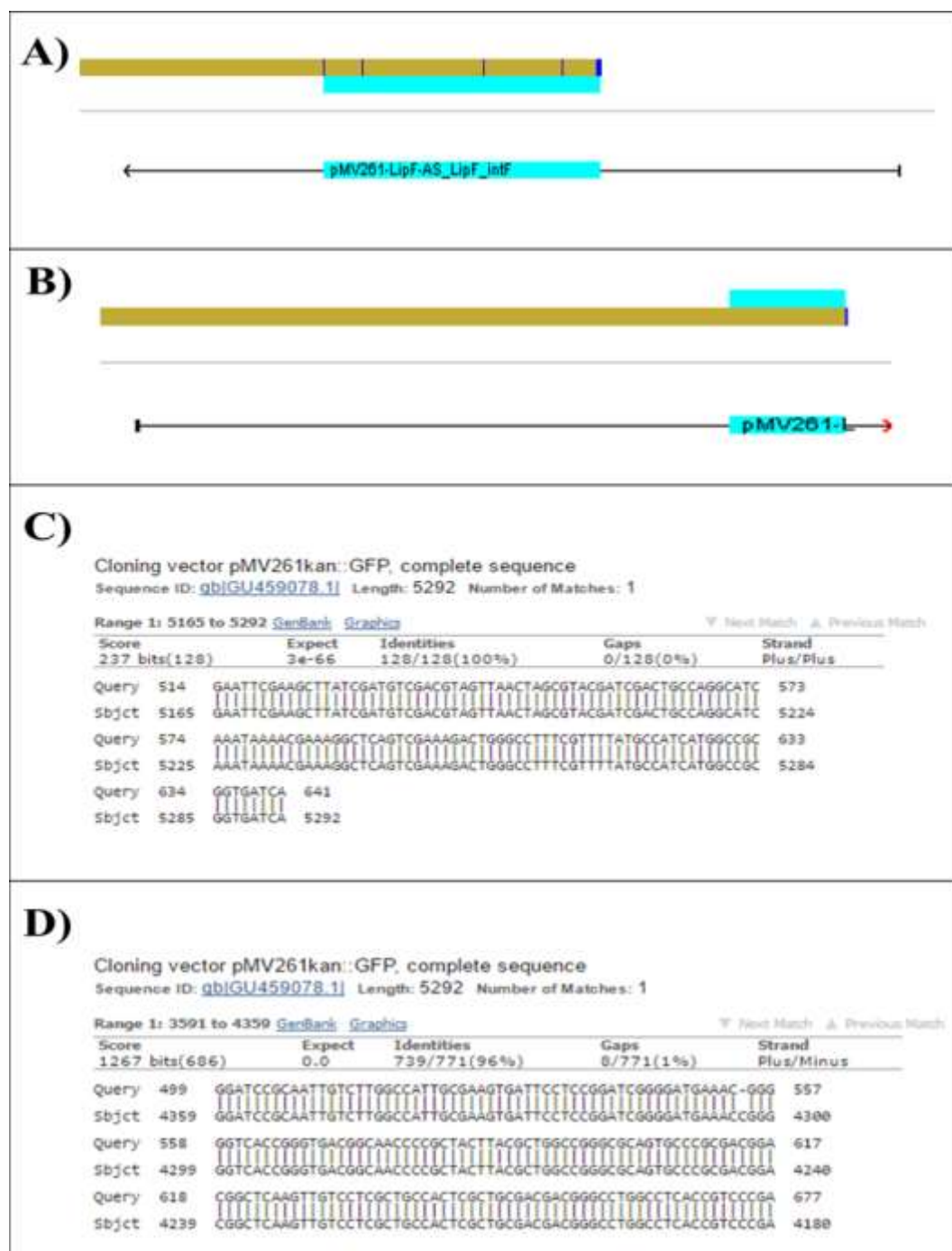


Figura 18. Evaluación de la fidelidad de la secuenciación automatizada de los candidatos pMV261-LipF usando el primer LipF interno F. A) y B) Mapa general de la secuenciación del candidato 1 y 4, respectivamente, comparando con la secuencia de referencia (el vector pMV261; Stover *et al.*, 1991). Las secuencias obtenidas se muestran en azul y la dirección está señalada con la punta de flecha. Resultados analizados usando el programa Seqscape v.2.7. C) Alineamiento del candidato 4 con el vector pMV261 (No. de Acceso 459078.1). D) Alineamiento del candidato 1 con el vector pMV261 (No. de Acceso 459078.1). Resultados analizados en la base de datos NCBI.

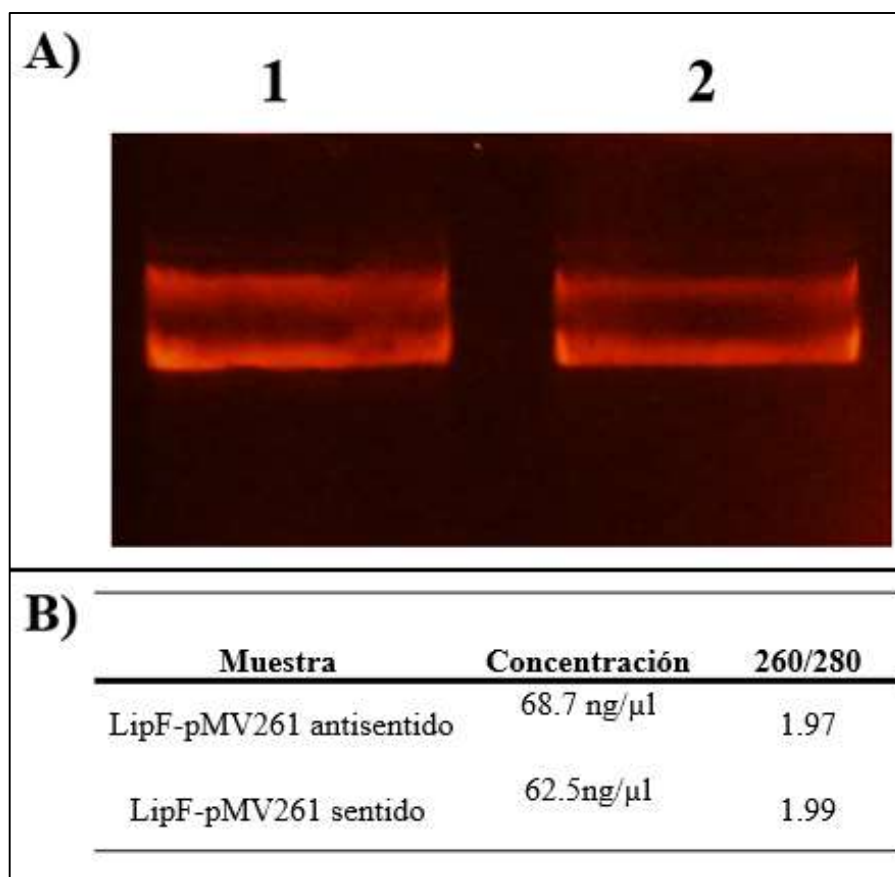


Figura 19. Purificación de las construcciones sentido y antisentido de pMV261-LipF. A) Electroforesis en gel de agarosa, Carril 1) pMV261-LipF antisentido, Carril 2) pMV261-LipF sentido. B) Determinación de la concentración y pureza de las muestras purificadas.

7.2 Cultivo y caracterización de la cepa mc²155 de *M. smegmatis*

La cepa ATCC mc²155 de *M. smegmatis* se activó en medios líquido 7H9 y sólido 7H10, observándose morfología colonial característica de *M. smegmatis* (Figura 20). Para caracterizar la cepa se realizó una tinción Ziehl-Neelsen donde se observaron bacilos alargados con características ácido alcohol resistentes (Figura 21).

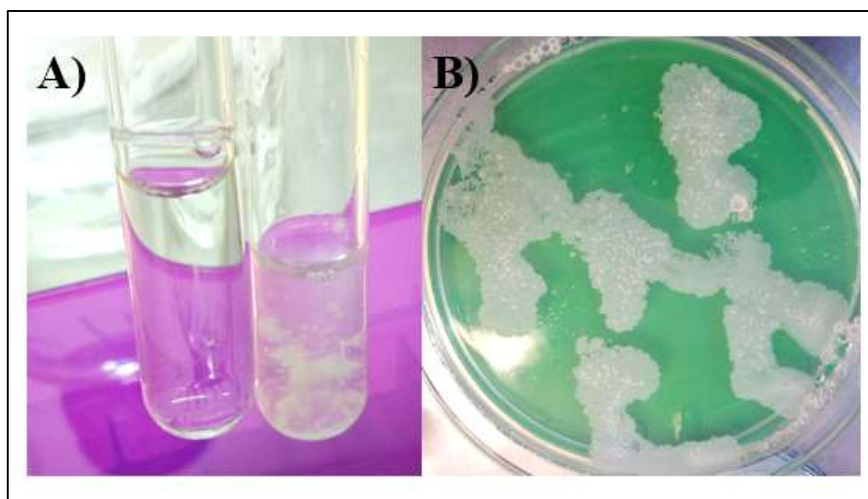


Figura 20. Activación y mantenimiento de la cepa ATCC mc²155 de *M. smegmatis*. A) Crecimiento en medio 7H9 suplementado con 10% de ADC. B) Crecimiento en agar 7H10 suplementado con 10% de OADC.

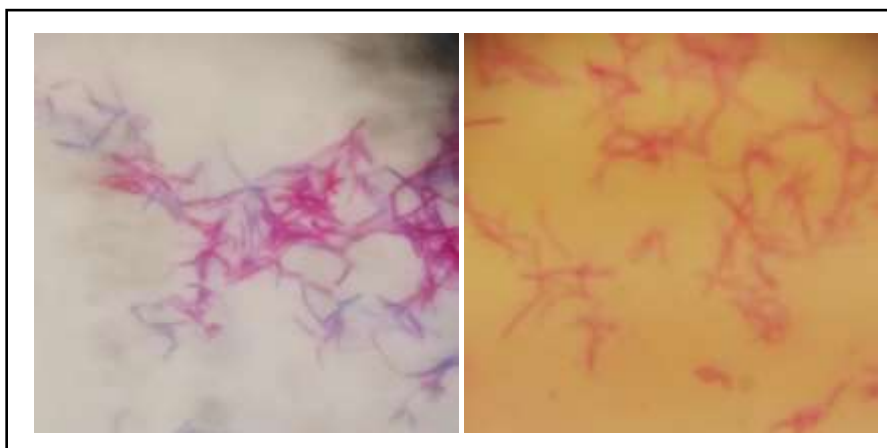


Figura 21. Morfología microscópica de la cepa ATCC mc² 155 de *M. smegmatis*. Bacterias teñidas usando la técnica de Ziehl-Neelsen, observadas en microscopio óptico 100×.

7.2.1 Curva de crecimiento de *M. smegmatis*

Se realizó la curva de crecimiento de *M. smegmatis* en medio 7H9 suplementado con 10% de ADC y 0.05% de Tween 80. A partir de las lecturas por nefelometría (expresadas en unidades McFarland) se determinó la fase exponencial entre las 12 a 24 horas (Figura 22).

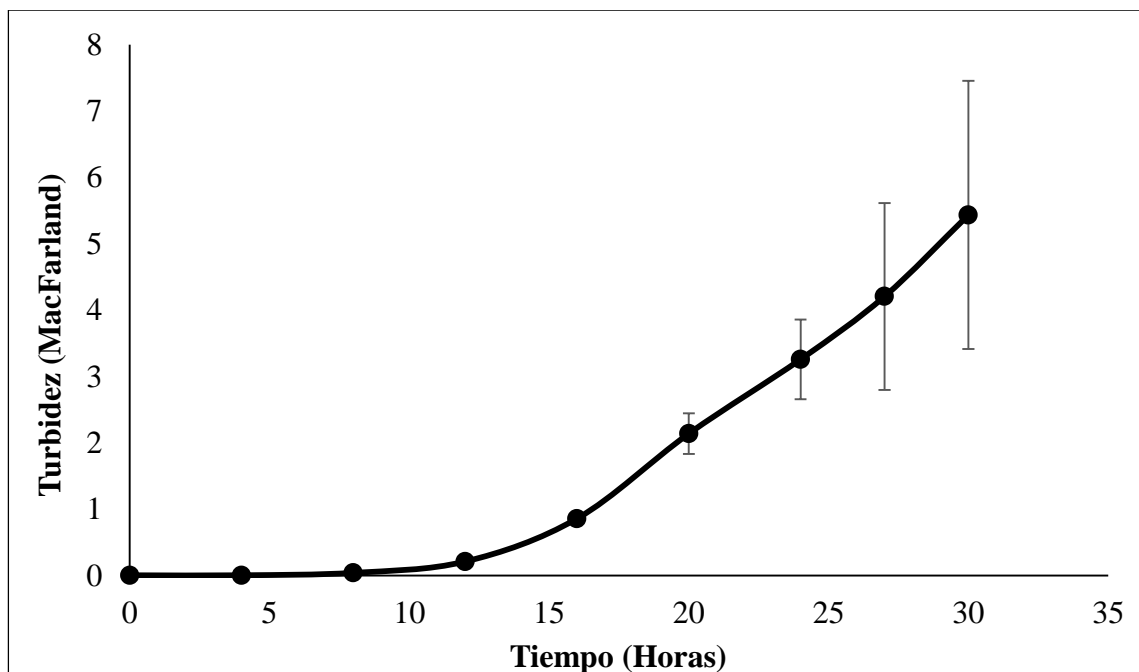


Figura 22. Curva de crecimiento de *M. smegmatis*. Crecimiento medido en medio 7H9 suplementado con 10% de ADC. El crecimiento se registró cada 4 horas en viales por triplicado usando el equipo DensiCHEK™ plus VITEK (Biomérieux). Las barras de error representan la desviación estándar.

7.2.2 Comparación de unidades de Mcfarland con densidad óptica y Unidades Formadoras de Colonias por mililitro en cultivos de *M. smegmatis*

Con la finalidad de comparar los sistemas de medición en el crecimiento de *M. smegmatis*, se realizaron evaluaciones por medio de espectrofotometría (unidades de densidad óptica a 600 nm, DO), nefelometría (unidades McFarland) y unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) en medio líquido cada 3 h. Con los datos obtenidos se realizó una ecuación de la recta para concluir que 1 unidad McFarland es el equivalente a 0.2437 DO en *M. smegmatis* (Figura 23) y es el equivalente a 3.08×10^7 UFC/mL (Figura 24). Se ha reportado que para realizar el ensayo de microdilución en placa utilizando el compuesto rezasurina se requiere un crecimiento de *M. smegmatis* a 0.6 DO, con los datos obtenidos de las comparaciones de unidades de crecimiento determinamos que este valor es equivalente a 2.7 McFarland.

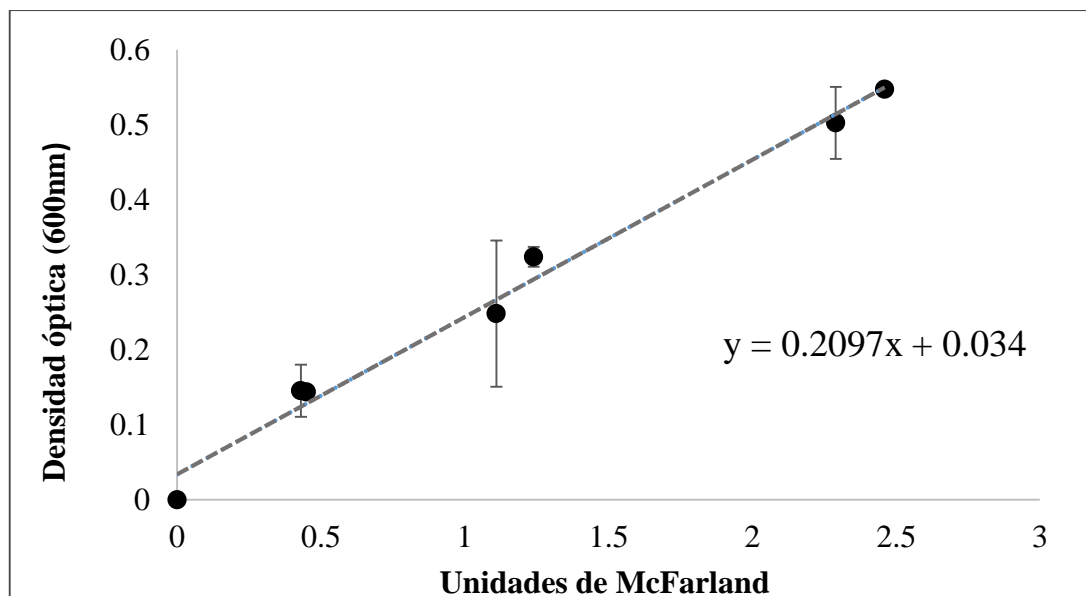


Figura 23. Comparación de crecimiento de *M. smegmatis* obtenido por unidades de McFarland y densidad óptica a 600 nm.

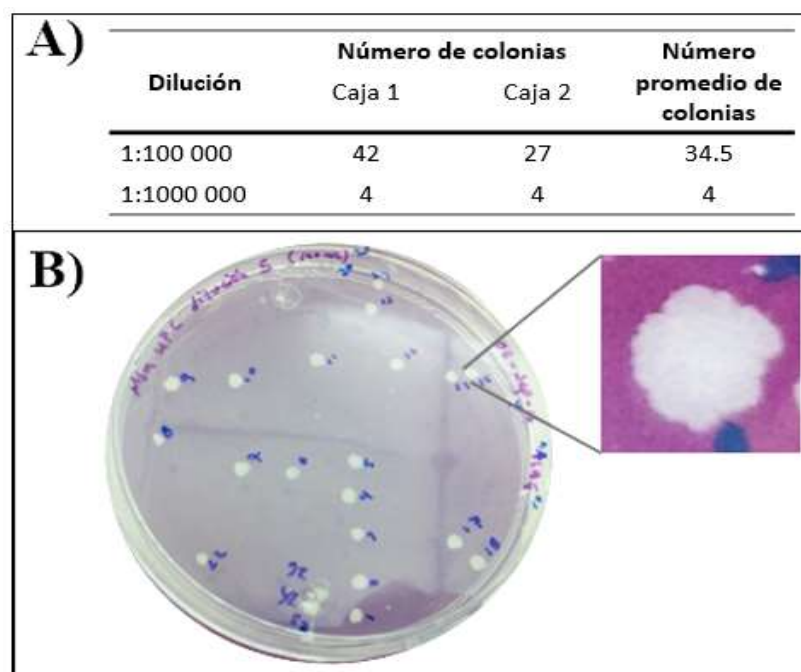


Figura 24. Crecimiento de *M. smegmatis*. Se evaluó el crecimiento mediante nefelometría (en unidades de McFarland) y en unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL). A) Número de colonias obtenidas en dos diluciones diferentes. B) Ejemplo del crecimiento de las colonias de *M. smegmatis* en medio 7H10 suplementado con 10% de OADC. Crecimiento observado a los 4 días de incubación.

7.3 Expresión de LipF en *M. smegmatis*

Los plásmidos pMV261 y pMV261-LipF se transformaron en la cepa mc²155 de *M. smegmatis*. Se obtuvieron 18 candidatos para pMV261-LipF que crecieron en medio sólido 7H10 con el fármaco de selección kanamicina (Figura 25).

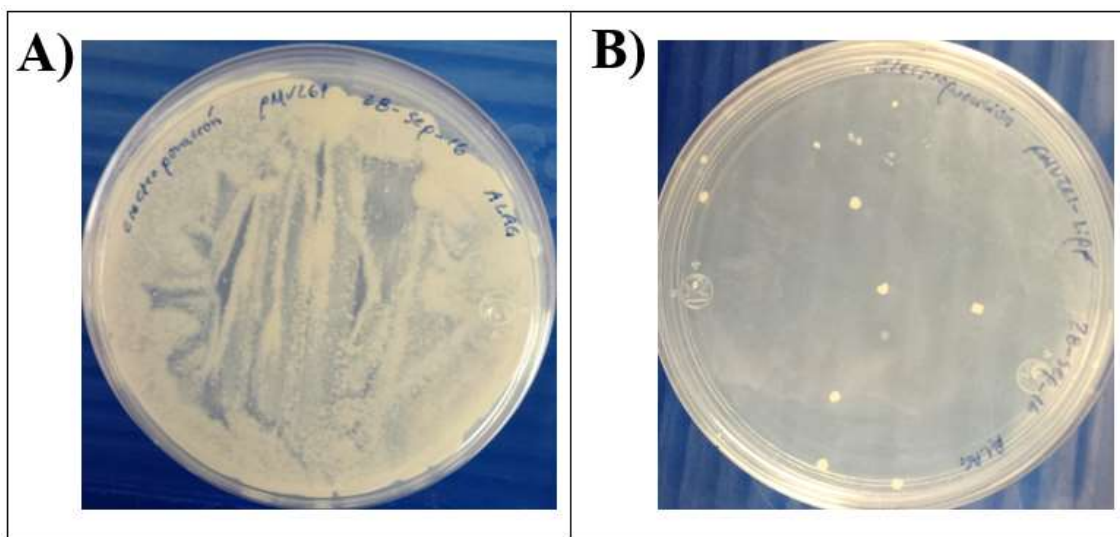


Figura 25. Transformación de *M. smegmatis* con la construcción pMV261-LipF. A) Se muestra el crecimiento en medio 7H10 sin fármaco. B) Candidatos de *M. smegmatis* que contienen la construcción pMV261-LipF en medio 7H10 con 20µg/mL de kanamicina.

7.4 Evaluación de la expresión de LipF en la condición de resistencia a fármacos en *M. smegmatis*

7.4.1 Amplificación de *lipF* por RT-PCR

Para demostrar que las micobacterias transformadas expresaban al gen *lipF* a partir del plásmido pMV261-LipF, se realizó la amplificación por RT-PCR punto final del gen *lipF*. El RNA total se aisló de la cepa conteniendo al plásmido pMV261-LipF: el RNA fue tratado con *DNasa I* con la finalidad de eliminar el DNA plasmídico presente en la muestra. Después se realizó una reacción de transcripción reversa para la obtención de DNA complementario y la posterior amplificación del gen *lipF*. Se obtuvo un producto de ~800 pb correspondiente a la secuencia codificante del gen *lipF*. las muestras que no

fueron tratadas con *DNasa* I generaron un producto de amplificación proveniente de DNA plásmidico (Figura 26). Con estos resultados se demostró que la amplificación del gen *lipF* proviene de la expresión ectópica contenida en el plásmido.

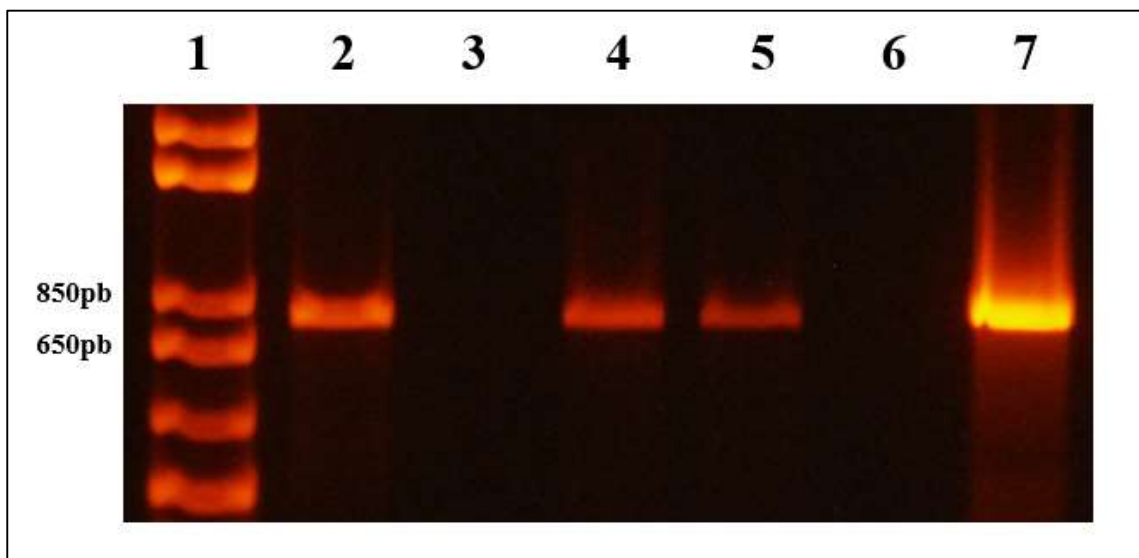


Figura 26. Expresión de *lipF* en *M. smegmatis* transformada con pMV261-LipF. 1) Marcador de peso molecular 1Kb plus, se utilizó como templado: 2) RNA de *M. smegmatis* pMV261-LipF con tratamiento de *Dnasa* I y retrotranscripción, 3) RNA de *M. smegmatis* pMV261-LipF con tratamiento de *Dnasa* I sin retrotranscripción, 4) RNA de *M. smegmatis* pMV261-LipF sin tratamiento de *Dnasa* I y con retrotranscripción, 5) RNA de *M. smegmatis* pMV261-LipF sin tratamiento de *Dnasa* I y sin retrotranscripción, 6) Control negativo, 7) Control positivo (DNA plásmidico pMV261-LipF).

7.4.2 Actividad de fármacos de primera línea en las cepas de micobacterias con expresión de LipF mediante el método de microdilución en placa con el compuesto rezasurina

Se realizaron ensayos de susceptibilidad a fármacos de primera línea para el tratamiento de la tuberculosis, usando el reactivo rezasurina, el cual cambia de color de azul a rosa cuando hay crecimiento permitiendo de esta manera identificar la CMI para cada fármaco. Primeramente se realizó este ensayo para la cepa *M. smegmatis* mc²155 sin transformar, encontrándose que las CMI son: 3.12 µg/mL para el fármaco RIF, 32 µg/mL para INH, mayor a 200 µg/mL para PZA y 0.5 µg/mL para EMB (Figura 28).

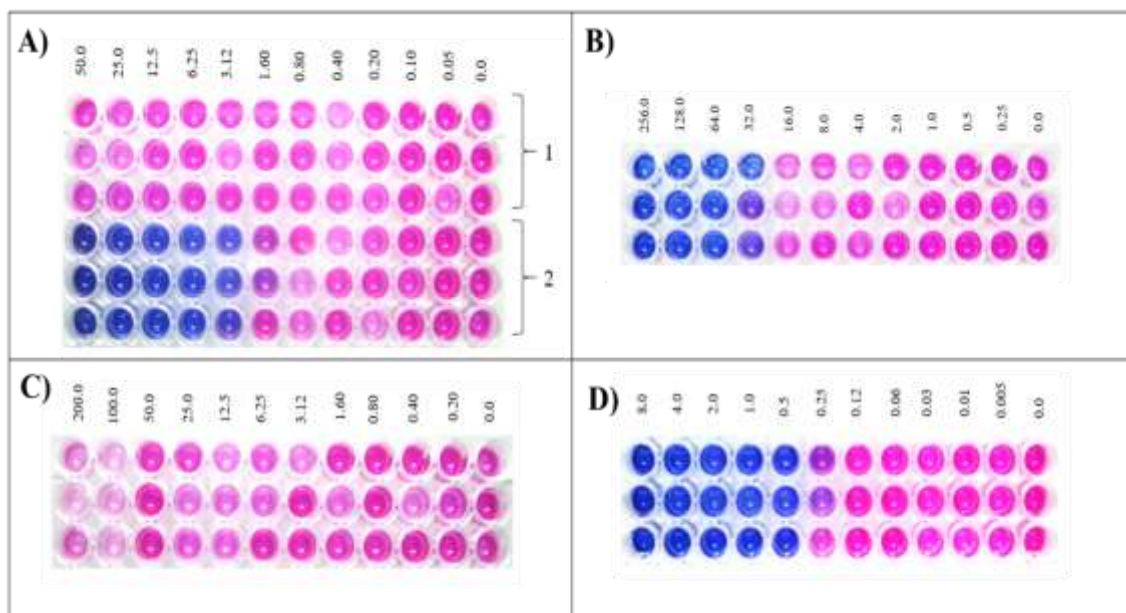


Figura 27. Concentraciones mínimas inhibitorias de *M. smegmatis* para los fármacos de primera línea. A) RIF, 1. Solvente (metanol), 2. RIF disuelta en metanol, B) INH, C) PZA, D) EMB. Los ensayos se realizaron por triplicado, unidades expresadas en µg/mL. El color rosa representa crecimiento microbiano.

Una vez determinadas las CMI de *M. smegmatis* mc²155 para los fármacos de primera línea se procedió a realizar el ensayo con la cepa transformada con la expresión ectópica del gen *lipF* (pMV261-LipF). Se utilizó como control una cepa transformada con el vector pMV261. Se observó que los fármacos INH, PZA y EMB no mostraron cambios en sus CMI. Sin embargo, en el caso del fármaco RIF se observó un fenómeno en el cual cambia la CMI de 3.12 µg/mL a 1.6 µg/mL en la cepa que expresa LipF en uno de los duplicados (Figura 28). El ensayo fue replicado y se observó nuevamente dicho fenómeno. Para confirmar este fenómeno se realizó una cinética de crecimiento usando al fármaco RIF en 3 concentraciones distintas de 0.8, 1.6 y 3.2 µg/mL. En la concentración mayor de RIF (3.12 µg/mL) y la menor (0.8 µg/mL) no se observaron diferencias en el crecimiento de las cepas; Sin embargo, cuando se utilizó la concentración de RIF de 1.6 µg/mL se encontró que la cepa de *M. smegmatis* transformada con pMV261-LipF el crecimiento fue menor a través del tiempo en

comparación con la cepa de *M. smegmatis* transformada con el vector pMV261 con una diferencia altamente significativa (Figura 29).

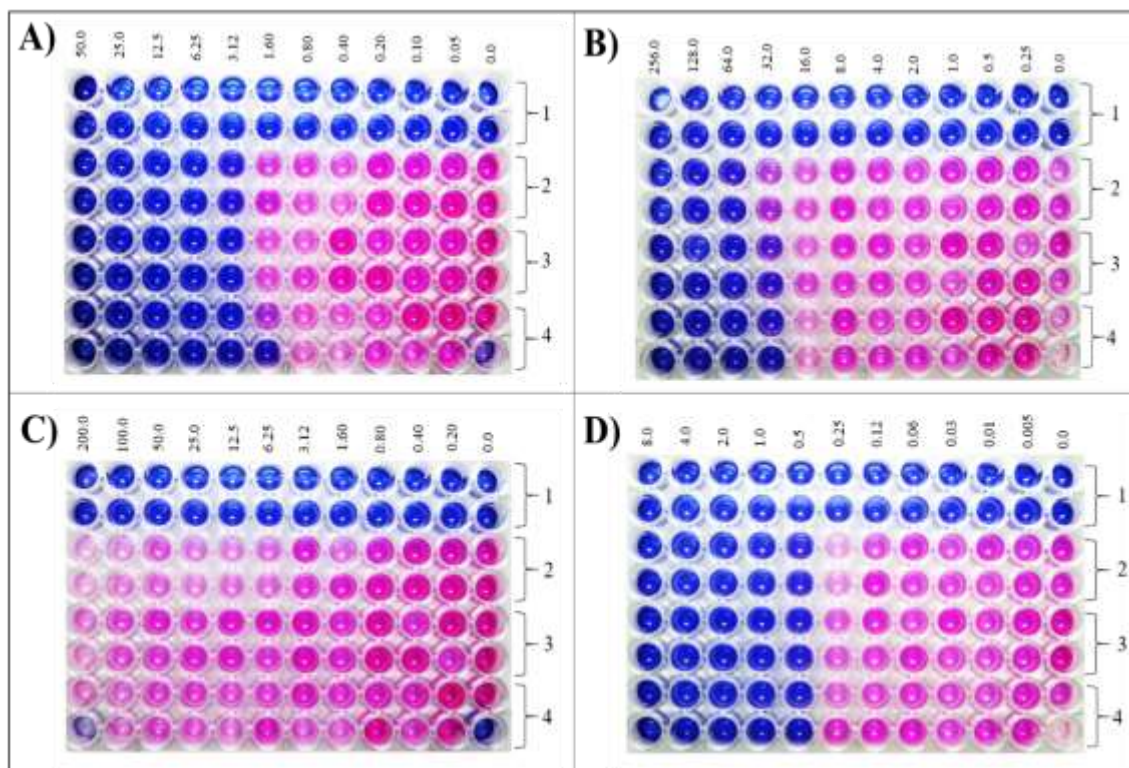


Figura 28. Concentraciones mínimas inhibitorias de *M. smegmatis* expresando LipF para los fármacos de primera línea. A) RIF, B) INH, C) PZA, D) EMB. Los números a la derecha de cada placa representan: 1. *M. smegmatis* en medio 7H9 con el fármaco a evaluar más kanamicina, 2. *M. smegmatis* en medio sin kanamicina y conteniendo el fármaco a evaluar, 3. *M. smegmatis* pMV261, 4. *M. smegmatis* pMV261-LipF. El medio de cultivo de las micobacterias transformadas contenía al fármaco a evaluar en las concentraciones indicadas más kanamicina 20 µg/mL, por ser este último el antibiótico de selección del plásmido. Los ensayos se realizaron por duplicado. Las concentraciones utilizadas están expresadas se µg/mL. El color rosa representa crecimiento microbiano.

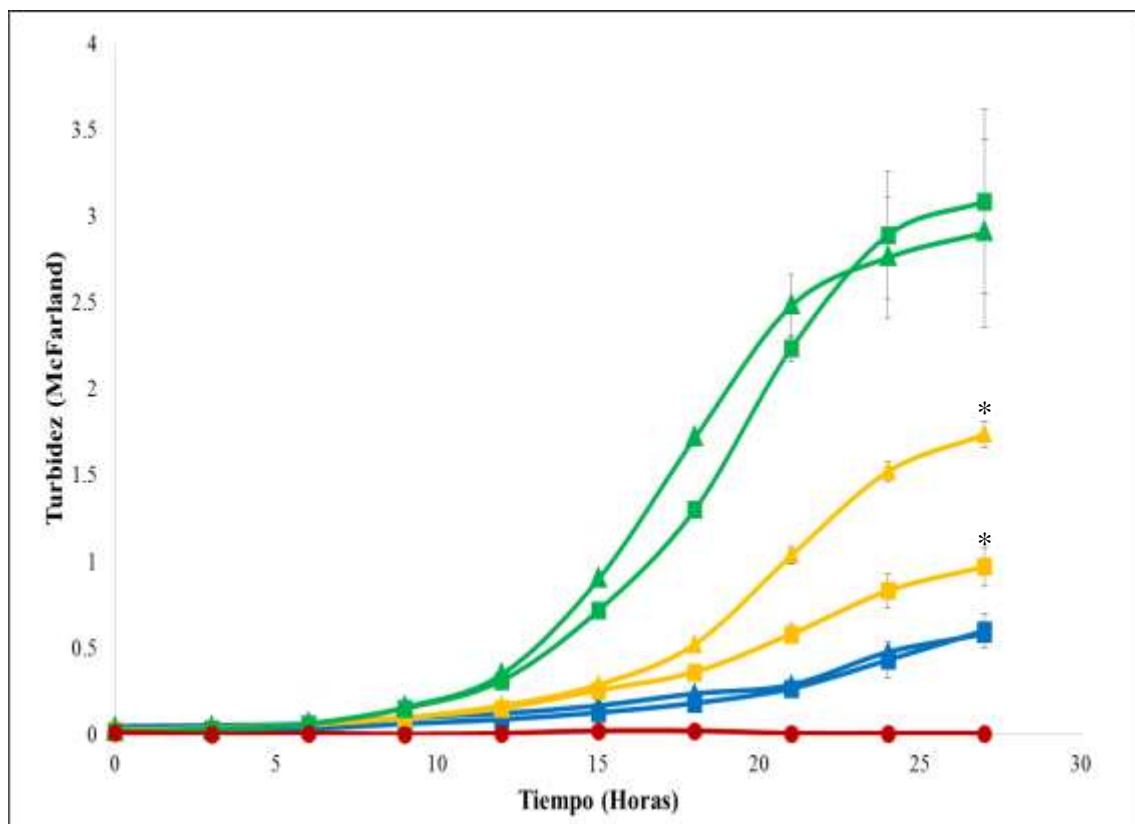


Figura 29. Curva de crecimiento con el fármaco RIF de *M. smegmatis* expresando LipF. Los símbolos ● indican *M. smegmatis*, ▲ indican *M. smegmatis* transformadas con pMV261 vacío y ■ indican *M. smegmatis* transformadas con pMV261-LipF. El color azul representa la curva de crecimiento para la concentración de 3.12 µg/mL de RIF, el color amarillo, la curva de crecimiento para la concentración de 1.6 µg/mL de RIF y el color verde la curva de crecimiento para la concentración de 0.8 µg/mL de RIF. El color rojo indica a *M. smegmatis* sin transformar en medio con kanamicina. El crecimiento en el medio 7H9 suplementado con 10% de ADC con 20 µg/mL de kanamicina se realizó por duplicado y las barras de error representan la desviación estándar. Las mediciones se realizaron por nefelometría (unidades McFarland). Marcados con * cuando hay una diferencia altamente significativa $P < 0.01$.

8. DISCUSION

E. coli es la bacteria más comúnmente usada para la expresión de proteínas recombinantes, sin embargo, el principal problema de expresar proteínas provenientes de *M. tuberculosis* en *E. coli* es la formación de cuerpos de inclusión, además de la diferencia de contenido G+C entre las dos cepas, requiriendo distinta maquinaria para una eficiente transcripción y traducción de genes micobacterianos. Debido a esto, se han buscado otras bacterias específicamente micobacterias para la expresión de genes de *M. tuberculosis*, dos de estos modelos son *M. smegmatis* y *M. vaccae*. La cepa mc²155 de *M. smegmatis* ha sido ampliamente utilizada para la expresión de genes provenientes de *M. tuberculosis* esto debido a que tiene una alta eficiencia de transformación, no es virulenta y ha sido usada para la expresión de genes utilizando plásmidos que contienen el promotor *hsp60* de *M. bovis* (Bashiri y Baker, 2014). Esta cepa se usó como modelo en el presente trabajo, y fue adquirida en ATTC por lo que se caracterizó encontrándose una morfología colonial característica, observándose colonias con bordes irregulares arrugadas de color blanco cremoso, además en la morfología microscópica se observaron bacilos alargados, curvos, ácido alcohol resistentes consistente con la reportado por Shi *et al*, 2011 y Gordon y Smith, 1953. De igual manera se realizó una curva de crecimiento encontrando la fase exponencial de las 12 a las 24 horas estos tiempos coinciden con los reportados anteriormente por Gonzales-y-Merchand, 2012 y Agrawal *et al*, 2015.

Los estándares de McFarland son usados para estimar la concentración de células en un cultivo microbiano, estos estándares son comparados con un número definido para microorganismos de *E. coli* por mililitros. Se asume que cualquier otra bacteria tiene concentraciones equivalentes de células en el mismo estándar. Sin embargo, Peñuelas-Urquides *et al*, 2013 reportaron que la cantidad de micobacterias, en este caso *M. tuberculosis* en una unidad de McFarland difiere a lo reportado para *E. coli* reportándose que 1 McFarland es equivalente a 1.97×10^6 UFC/mL ó 0.39 DO. Debido a esto se realizó un ensayo para determinar equivalencias entre McFarland, DO y UFC/mL en *M. smegmatis*. Encontrando que la cepa *M. smegmatis* mc²155 presentaba 3.08×10^7 UFC/mL equivalente a 0.2437 DO y a 1 de McFarland.

Para la electroporación se utilizó la cantidad de 250 ng de la construcción pMV261-LipF una cantidad de DNA aproximada ya había sido reportada por Panas *et al*, 2014 quienes usaron 200 ng de DNA para transformar *M. smegmatis* con una buena eficiencia. Usando 250 ng de DNA plásmidico obtuvimos 18 candidatos.

Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) son consideradas el estándar de oro para determinar la susceptibilidad de los organismos a los antimicrobianos. Estas son definidas como la concentración más baja que puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo después de un tiempo de incubación (Andrews, 2001). En este trabajo se realizó el ensayo de sensibilidad a fármacos de primera línea mediante microdilución en placa usando el compuesto resazurina para la determinación de las CMI en *M. smegmatis*, en el caso del fármaco PZA la CMI se marcó como mayor a 200 µg/mL, esto es debido a que naturalmente esta bacteria es resistente a PZA con una CMI reportada de 2,200 µg/mL, ya que aunque tiene la enzima pirazinamidasas que convierte al profármaco en su forma activa (ácido piracinoico) esta bacteria contiene una bomba *efflux* que no permite la acumulación de ácido piracinoico dentro de *M. smegmatis* y por lo tanto esta forma activa no se encuentra disponible para llevar a cabo su mecanismo de acción (Boshoff y Mizrahi, 2000, Raynaud *et al*, 1999, Zhang *et al*, 1999). En los otros tres fármacos se mostró una discordancia en las CMI (RIF 3.12 µg/mL, INH 32 µg/mL, EMB 0.5 µg/mL) con respecto a lo reportado por Agrawal *et al*, 2015 ya que ellos indican CMI de 0.8 µg/mL para RIF, 8.0 µg/mL para INH, 0.25 µg/mL para EMB. La diferencia en las CMI observada podría deberse a que los autores indican haber sellado las placas de 96 pozos durante la incubación de 40 h para evitar que el medio se secase; este procedimiento puede reducir la cantidad de O₂ disponible para el crecimiento de las micobacterias, pudiendo ser esto un factor importante ya que hemos observado al trabajar con la cepa de *M. smegmatis* mc²155 en el laboratorio que al tener una menor aireación durante la incubación el crecimiento se retrasa. También se ha reportado que el sellar las cajas de cultivo con parafilm influye en la formación de biofilm (Ojha *et al*, 2008). Sin embargo, a pesar de que las CMI son diferentes a las reportadas por Agrawal *et al*, 2015 nuestros resultados fueron reproducibles.

Cuando se retó a la cepa expresando LipF con los fármacos de primera línea observamos que en el caso de EMB, INH y PZA no se observaron cambios en sus CMI. Sin embargo, con el fármaco RIF la cepa que expresaba *lipF* mostró una variación en la CMI en un duplicado, de 3.12 a 1.6 µg/mL lo que podría ser indicativo que la cepa es más sensible a este fármaco. Para comprobar el este fenómeno fue necesario realizar otro ensayo en el que observáramos el comportamiento de la cepa de *M. smegmatis* expresando *lipF* y compararlo con la cepa que no lo expresa. Para lo anterior, se realizaron cinéticas de crecimiento en medio líquido conteniendo concentraciones de RIF de 3.12, 1.6 y 0.8 µg/mL, observando que en la concentración de 3.12 y 0.8 µg/mL ambas cepas mostraban el mismo comportamiento. Sin embargo, en la concentración de RIF de 1.6 µg/mL, el crecimiento de *M. smegmatis* expresando *lipF* fue menor que en el control, con lo que podemos concluir que la expresión del gen *lipF* en *M. smegmatis* confiere una mayor sensibilidad al fármaco RIF. Un comportamiento similar al que registramos en nuestros resultados lo observó Liu *et al*, 2016, en donde sobreexpresaron un posible factor de transcripción de la familia TetR en *M. smegmatis* usando el vector pMV261, observaron que al sobreexpresar este factor el crecimiento de la cepa era menor en comparación al control (*M. smegmatis* pMV261) en medio conteniendo 1.5 µg/mL de RIF, este factor de transcripción está relacionado con la regulación de genes que codifican para proteínas de transporte. En un análisis *in silico* realizado para la búsqueda de posibles factores de transcripción en *lipF* se relacionó a la familia TetR en la regulación de este gen, por lo que podríamos inferir que la sobreexpresión de TetR hubiera aumentado la expresión de una enzima lipolítica parecida a *lipF* en *M. smegmatis* lo que conllevara a disminuir el crecimiento en medio con el fármaco RIF.

9. CONCLUSIONES

- Se construyó el plásmido pMV261-LipF, el cual tiene la secuencia codificante del gen *lipF* en dirección sentido y con marco abierto de lectura completo.
- El gen *lipF* se expresó del vector pMV261-LipF en *M. smegmatis*.
- La concentración mínima inhibitoria, por efecto de los fármacos isoniazida, pirazinamida y etambutol, no se modificó en la cepa que expresa al gen *lipF* en *M. smegmatis*.
- La expresión de LipF incrementó la sensibilidad de *M. smegmatis* al fármaco de primera línea rifampicina.

10. PERSPECTIVAS

- Confirmar la expresión de la proteína LipF en la cepa *M. smegmatis* pMV261-LipF.
- Medir la actividad de lipasa en cepas transformadas con el plásmido pMV261-LipF.
- Identificar y caracterizar los elementos y factores de transcripción involucrados en la activación/regulación del gen *lipF*.

BIBLIOGRAFÍA

Agrawal P, Miryala S, Varshney U. 2015. Use of *Mycobacterium smegmatis* deficient in ADP-ribosyltransferase as surrogate for *Mycobacterium tuberculosis* in drug testing and mutation analysis. Plos One 10: 1-13.

Andrews JM. 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. Journal of antimicrobial chemotherapy 48: 5-16.

Bashiri G, Baker EN. 2014. Production of recombinant proteins in *Mycobacterium smegmatis* for structural and functional studies. Protein science 21:1-10.

Becerril-Montes P, Said-Fernández S, Luna-Herrera J, Caballero-Olín G, Ensiso-Moreno JA, Martínez-Rodríguez GH, Padilla-Rivas G, Nancy-Garza-Treviño E, Molina-Salinas GM. 2013. A population-based study of first and second-line drug-resistant tuberculosis in a high-burden area of the Mexico/United States Border. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 108: 160-166.

Boletín Epidemiológico Nacional, Semana 35, 2016 [online]. Disponible en: http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/dgae/boletin/intd_boletin.html. Consultado el 18 de Septiembre a las 17:52 horas.

Boshoff HIM, Mizrahi V. 2000. Expression of *Mycobacterium smegmatis* pirazinamidase in *Mycobacterium tuberculosis* confers hypersensitivity to pyrazinamide and related amides. Journal of bacteriology 182:5479-5485.

Brust B, Lecoufle M, Tuailon E, Dedieu L, Canaan S, Valverde V, Kremer L. 2011. *Mycobacterium tuberculosis* Lipolytic Enzymes as Potential Biomarkers for the Diagnosis of Active Tuberculosis. Plos one 6:1-10.

Campen RI, Ackerley DF, Cook GM, O'Toole R. 2015. Development of a *Mycobacterium smegmatis* transposon mutant array for characterizing the mechanism of action of tuberculosis drugs: Findings with isoniazid and its structural analogues. Tuberculosis 2015: 1-8.

Centers for Disease Control and Prevention. Tuberculosis [Online]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/tb/>. Consultado el 11 de Julio del 2015 a las 23:50 horas.

Chaoui I, Sabouni R, Kourout M, Jordaan AM, Lahlou O, Elouad R, Akrim M, Victor TC, Elmzibri M. 2009. Analysis of isoniazid, streptomycin and ethambutol

resistence in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Morocco. The Journal of Infections in Developing Countries. 3: 278-284.

Chen L, Dang G, Deng X, Cao J, Yu S, Wu D, Pang H, Liu S. 2014. Characterization of a novel exported esterase RV3036c from *Mycobacterium tuberculosis*. Protein Expression and Purification. 104: 50-56.

Coll P. 2003. Fármacos con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*. Formación Médica Continuada. 21: 299-308.

Dye C, Williams BG. 2010. The Population Dynamics and Control of Tuberculosis. Science 328: 856-861.

Gao Q, Krpke KE, Saldanha AJ, Yan W, Holmes S, Small PM. 2005. Gene expression diversity among *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. Microbiology 151:5-14.

Gonzales M, Saviola B. 2009. Mutational analysis of the -10 region from *Mycobacterium tuberculosis lipF* promoter. Molecular Biology Reports 36:1225-1229.

Gonzales-y-Merchand JA, Zaragoza-Contreras R, Guadarrama-Medina R, Helguera-Repetto AC, Rivera-Gutierrez S, Cerna-Cortes JF, Santos-Argumedo L, Cox RA. 2012. Evaluation of the cell growth of micobacteria using *Mycobacterium smegmatis* mc² 155 as a representative species. The journal of microbiology 50: 419-425.

Gonzalez-Escalante L, Peñuelas-Urquides K, Said-Fernández, Bermúdez de León M. Publicación en proceso. Gene expression among *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in highly variable.

Gordon RE, Smith MM. 1953. Rapidly growing, acid fast bacteria. Journal of bacteriology 69(5): 502-507.

Gueetha VR, Balganesesh TS. 2015. Exploring the potential of adjunct therapy in tuberculosis. Trends in Pharmacological Sciences 2015:1-8.

Guirado E, Schelesinger LS, Kaplan G. 2013. Macrophages in Tuberculosis: Friend or Foe. Seminars in Immunopathology 35: 563-583.

Hilleman D, Rüsç-Gerdes S, Ritcher E. 2009. Feasibility of the genotype MTBDRsl assay for flouroquinolone amikacin-capreomycin, and etambutol resistance

testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens. Journal of clinical microbiology 47:1767-1772.

Homolka S, Niemann S, Russell DG, Rohde KH. 2010. Functional genetic diversity among *Mycobacterium tuberculosis* complex clinical isolates: delineation of conserved core and lineage-specific transcriptomes during intracellular survival. Plos Pathogens 6:1-17.

Kumar A, Farhana A, Guidry L, Saini V, Hondalus M, Steyn AJC. 2011. Redox homeostasis in mycobacteria: the key to tuberculosis control?. Expert reviews in molecular medicine. 13:1-25.

Liu H, Yang M, He ZG. 2016. Novel TetR family transcriptional factor regulates expression of multiple transport-related genes and affects rifampicin resistance in *Mycobacterium smegmatis*. Scientific reports. 6: 1-10.

Learner TR, Borel S, Gutierrez MG. 2015. The innate immune response in human tuberculosis. Willey online library.

LoBue P. 2009. Extensively drug-resistant tuberculosis. Current opinion in infectious diseases 22:167-173.

Madigan MT, Martinko JM, Parker J. 2005. Brook: Biología de los Microorganismos. Pearson Prentice Hall, pp. 412-414.

Maeurer M, Zumla A. 2014. The Host Battles Drug-Resistant Tuberculosis. Science translational Medicine 6:1-3.

Ojha AK, Baughn AD, Sambandan D, Hsu T, Trivelli X, Guerardel Y, Alahari A, Kremer L, Jacobs Jr WR, Hatfull GF. 2008. Growth of *Mycobacterium tuberculosis* biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria. Molecular microbiology 69(1):164-174.

Organización Mundial de la Salud 2005. Tuberculosis [Online]. Disponible en: <http://www.who.int/es/>. Consultado el 12 Julio del 2015 a las 16:00 horas.

Organización Mundial de la Salud. 2013. Manual de bioseguridad en el laboratorio de tuberculosis. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.

Organización Mundial de la salud. 2015. Global Tuberculosis Report 2015. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.

Panas MW, Jain P, Yang H, Mitra S, Biswas D, Wattam AR, Letvin NL, Jacobs, Jr R. 2014. Noncanonical SMC protein in *Mycobacterium smegmatis* restricts maintenance of *Mycobacterium fortuitum* plasmids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(37):13264-13271.

Peñuelas-Urquides K, González-Escalante L, Villarreal-Treviño L, Silva-Ramírez B, Gutiérrez-Fuentes DJ, Mojica-Espinosa R, Rangel-Escareño C, Uribe-Figueroa I, Molina-Salinas GM, Dávila-Velderrain, Castorena-Torres F, Bermúdez de León M, Said-Fernández S. 2013. Comparasion of gene expression profiles between pansensitive and multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Current Microbiology* 67:362-371.

Peñuelas-Urquides K, Villarreal-Treviño L, Silva-Ramírez B, Rivadeneyra-Espinoza L, Said-Fernández S, Bermúdez de León M. 2013. Mesasuring of *Mycobacterium tuberculosis* growth. A correlation of the optical measurements with colony forming units. *Brazilian Journal of Microbiology* 44(1):287-290.

Rastogi S, Agarwal P, Krishnan MY. 2015. Use of an adipocyte model to study the transcriptional adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* to store and degrade host fat. *International journal of Mycobacteriology* 5(2016): 92-98.

Rattan A, Kalia A, Ahmad N. 1998. Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: Molecular perspectives. *Emerging infectious Diseases* 4:195-209.

Raviglione MC. 2015. Tuberculosis. In: Harrison's Principles of Internal Medicine, Dennis Kasper (eds). McGraw-Hill New York. Access medicine we. 10 Jul. 2015. <http://accessmeicine.mhmedcal.com/content.aspx2book>.

Raynaud C, Lanéelle MA, Senaratne RH, Draper P, Lanéelle G, Daffé M. 1999. Mechanisms of pyrazinamide reistance in mycobacteria: importance of lack of uptake in addition to lack of pyrazinamidase activity. *Microbiology* 145 (1999): 1359-1367.

Reddy TBK, Riley R, Wymore F, Montgomery P, DeCaprio D, Engels R, Gellesch M, Hubble J, Jen D, Jin H, Koershsen M, Larson L, Mao M, Nitzberg M, Sisk P, Stolte C, Weiner B, White J, Zachariah ZK, Sherlock G, Galagan JE, Ball CA, Schoolnik GK. 2009. TB database: an integrated platform for tuberculosis research. *Nucleic acids research* 37:499-508.

Regazzi M, Carvalho AC, Villani P, Matteelli A. 2014. Treatment optimization in patients co-infected with HIV and *Mycobacterium tuberculosis* infections: focus on drug-drug interactions with rifamycins. *Clinical pharmacokinetics* 53:489-507.

Rich RR. 2008. Vacunas, Adjuvantes. In: *Clinical Immunology*. El selvier. p:1353-1385.

Riley LW. 2007. Of mice, men, and elephants: *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and pathogenesis. *The Journal of Clinical Investigation* 116:1475-1478.

Russel DG. 2003. Phagosomes, fatty acids and tuberculosis. *Nature cell biology* 5:776-778.

Satoh T, Hosokawa M. 2006. Structure, function and regulation of carboxylesterases. *Chemico-biological interactions* 162:192-211.

Shehzad A, Rehman G, Ul-Islam M, Khattak WA, Lee YS. 2013. Challenges in the development of drugs for the treatment of tuberculosis. *The Brazilian Journal of Infectious diseases*. 17:74-81.

Shi W, Zhang X, Jiang X, Yuan H, Lee JS, Clifton EB, Wang H, Zang W, Zang Y. 2011. Purazinamide Inhibits trans-translation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 333:1630-1632.

Singh AK, Reyrat JM. 2009. Laboratoy Maintenance of *Mycobacterium smegmatis*. *Current protocols in microbiology*. Unit 10C.1.

Somosky A, Parsons LM, Salfinger M. 2001. The molecular bais of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respiratory research* 2:164-168.

Srinivas M, Rahakumari S, Narayana Y, Joshi B, Katoch VM, Rajasekharan R, Balaji KN. 2008. Functional characterization of the phospholipase C activity of Rv3487c and its localization on the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biosciences* 33:221-230.

Stephan J, Bail JG, Titgemeyer F, Niederweis M. 2004. DNA-free RNA preparatios from mycobacteria. *Biomed central microbiology*. 4(45):1-3.

Stover CK, de la Cruz V.F., Fuerst TR, Burlein JE, Benson LA, Bennett LT, Bansal GP, Young JF, Lee MH, Hatfull GF, Snapper SB, Barletta RG, Jacobs Jr WR, Bloom BR. 1991. New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature* 351: 456-460.

Todar K. Todar's Online Textbook of Bacteriology. *Mycobacterium tuberculosis* and Tuberculosis [Online]. Disponible en: <http://textbookofbacteriology.net/tuberculosis.html> . Consultado el 26 de Junio del 2015 a las 11:30 horas.

Xu J, Yin L, Xu Y, Li Y, Zalzal M, Cheng G, Zhang Y. 2014. Hepatic carboxylesterase 1 is induced by glucose and regulates postprandial glucose levels. Plos one 9:1-7.

Zazueta-Beltrán J, León-Sicairos N, Muro-Amador S, Flores-Gaxiola A, Velazquez-Roman J, Flores-Villaseñor H, Canizalez-Roman A. 2011. Increasing drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Sinaloa, Mexico, 1997-2005. International Journal of Infectious Diseases 14:e272-e276.

Zhang M, Wang JD, Li ZF, Xie J, Yang YP, Zhong Y, Wang H. 2005. Expression and characterization of the carboxyl esterase Rv3487c from *Mycobacterium tuberculosis*. Protein expression y purification 42: 59-66.

Zhang Y, ScorpioA, Nikaido H, Sun Z. 1999. Role of acid pH and deficient efflux of pyrazinoic acid in unique susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. Journal of bacteriology 181(7):2044-2049.

Zheng H, Lu L, Wang B, Pu S, Zhang X, Zhu G, Shi W, Zhang L, Wang H, Wang S, Zhao G, Zhang Y. 2008. Genetic basis of virulence attenuation revealed by comparative genomic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Ra versus H37Rv. Plos One 3:1-12.

RESUMEN BIBLIOGRÁFICO

Ana Leticia Arriaga Guerrero

Candidata para el Grado de

Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología

Tesis: **EFFECTO DE LA EXPRESIÓN DE LA LIPASA LipF EN LA RESISTENCIA A FÁRMACOS DE PRIMERA LÍNEA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE *Mycobacterium tuberculosis*.**

Campo de Estudio: Microbiología Molecular.

Datos Personales: Nacida en Culiacán, Sinaloa el 9 de Febrero de 1991, hija de Luis Fernando Arriaga Ramos y Olga Leticia Guerrero Ahumada.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Sinaloa, Grado obtenido Licenciada Química Farmacéutica Bióloga.